

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



Bc. Monika Paúrová

Bifunkční chelatanty pro selektivní komplexaci mědi

Bifunctional Chelators for Selective Copper(II) Binding

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného Grantu GAČR P207/11/1437.

„Moudrost je cesta, kterou lidská duše jde za svou dokonalostí. A to je možné dvěma způsoby: věděním a činností.“

Avicenna

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. května 2012

Název: Bifunkční chelatanty pro selektivní komplexaci mědi

Řešitel: Bc. Monika Paúrová

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

E-mail školitele: modrej@natur.cuni.cz

Abstrakt: V rámci této diplomové práce byly připraveny a studovány cyklamové bifunkční deriváty nesoucí fosfinátové pendantní skupiny (4-methyl-11-*p*-aminobenzyl-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,8-bis(methylenfosfinová kyselina)) a fosfonátové pendantní skupiny (4-methyl-11-*p*-aminobenzyl-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,8-bis(methylenfosfonová kyselina)) jako potenciální ligandy vhodné pro komplexaci dvojmocné mědi s možností navázání na makromolekulární nosič.

Klíčová slova: radiomedicína, měď, cyklam, ligand, fosfinát, fosfonát, kinetická inertnost, kinetická labilita, termodynamická stabilita

Title: Bifunctional chelators for selective copper(II) binding

Autor: Bc. Monika Paúrová

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science

Supervisor: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Supervisor's e-mail: modrej@natur.cuni.cz

Abstract: In this Master thesis, cyclam bifunctional derivatives bearing pendant phosphinate groups (4-methyl-11-*p*-aminobenzyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,8-bis(methylenephosphinic acid)) and phosphonate groups (4-methyl-11-*p*-aminobenzyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,8-bis(methylenephosphonic acid)), were prepared and studied as potential ligands for complexation of divalent copper. These ligands are suitable for binding to a macromolecular carrier.

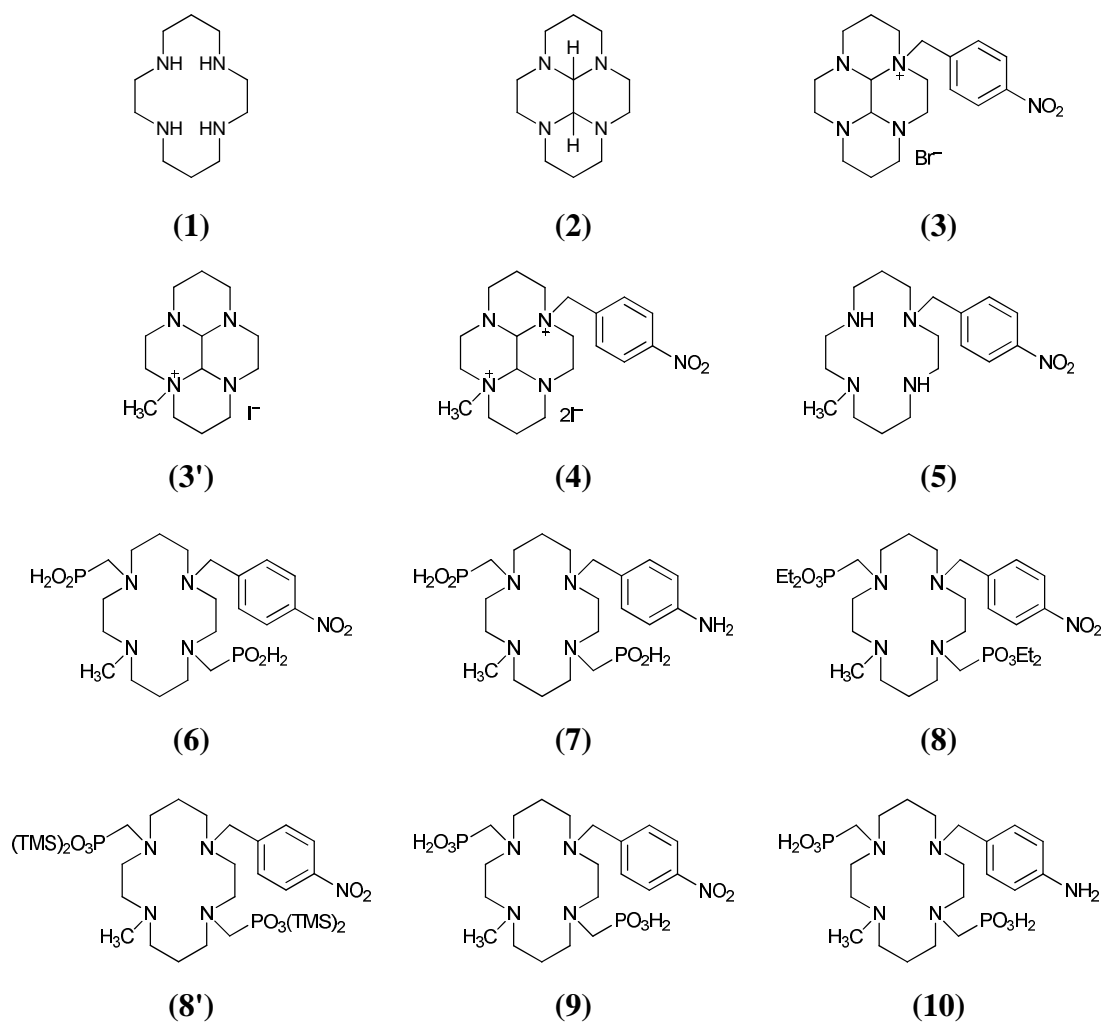
Keywords: radiomedicine, copper, cyclam, chelating agent, phosphinate, phosphonate, kinetic inertness, kinetic lability, thermodynamic stability

Obsah

1. Teoretický úvod	- 8 -
1.1. Nukleární medicína^[1,2,3]	- 8 -
1.1.1. Radiodiagnostické metody^[1,3,4,5]	- 9 -
1.1.2. Radioterapeutické metody^[1,3,4,7]	- 11 -
1.2. Měď	- 12 -
1.2.1. Obecné vlastnosti^[8,9,10,11]	- 12 -
1.2.2. Izotopy mědi a jejich příprava^[13,14,15,16]	- 12 -
1.2.3. Radiochemické separace radioizotopů mědi^[17,18,19,20]	- 14 -
1.3. Ligandy komplexující měď^[21,22]	- 14 -
1.4. Teoretické pozadí diplomové práce	- 17 -
1.5. Cíl diplomové práce	- 19 -
2. Experimentální část.....	- 20 -
2.1. Seznam použitých chemikálií	- 20 -
2.2. Metody charakterizace	- 20 -
2.2.1. Nukleární magnetická rezonance (NMR)^[35]	- 20 -
2.2.2. Hmotnostní spektrometrie (MS)	- 20 -
2.2.3. Rentgenová strukturní analýza	- 21 -
2.2.4. Tenkovrstvá, sloupcová a iontoměničová chromatografie	- 21 -
2.2.5. Elementární analýza	- 21 -
2.2.6. Spektrofotometrická měření.....	- 21 -
2.3. Schéma syntézy	- 22 -
2.4. Syntéza výchozích látek	- 23 -
2.4.1. Příprava cyklamu (1) ^[36,37,38]	- 23 -
2.5. Syntéza a hydrolýza kvarterních solí	- 25 -
2.5.1. Příprava látky (4) přes meziprodukt (3)	- 25 -
2.5.2. Pokus o přípravu látky (4) přes meziprodukt (3')	- 27 -
2.5.3. Příprava látky (5)	- 28 -
2.6. Navázání fosfinátových pendantních ramen a příprava ligandu (7).....	- 30 -
2.6.1. Příprava látky (6)	- 30 -
2.6.2. Příprava látky (7)^[41]	- 31 -
2.7. Navázání fosfonátových pendantních ramen a redukce nitro skupiny.....	- 33 -
2.7.1. Příprava látky (8)	- 33 -

2.7.2. Příprava látky (9)	- 34 -
2.7.3. Příprava látky (10) ^[41]	- 35 -
2.8. Termodynamické vlastnosti komplexů	- 40 -
2.8.1. Potenciometrické titrace ligandu (7).....	- 40 -
2.8.2. Potenciometrické titrace ligandu (10).....	- 40 -
2.9. Formační a disociační kinetiky	- 40 -
2.9.1. Formační a disociační kinetiky Cu-(7) ^[42]	- 41 -
2.9.2. Formační a disociační kinetiky Cu-(10)	- 42 -
3. Výsledky a diskuze	- 44 -
3.1. Syntéza výchozích látek	- 45 -
3.2. Syntéza a hydrolýza kvarterních solí	- 45 -
3.3. Navázání fosfinátových pendantních ramen a příprava ligandu (7).....	- 47 -
3.4. Navázání fosfonátových pendantních ramen a příprava ligandu (10)	- 48 -
3.5. Potenciometrické titrace látky (7).....	- 50 -
3.6. Potenciometrické titrace látky (10).....	- 52 -
3.7. Srovnání termodynamických vlastností komplexů Cu-(7) a Cu-(10).....	- 54 -
3.8. Formační a disociační kinetiky	- 57 -
3.8.1. Formační kinetiky komplexu (7) a (10)	- 59 -
3.8.2. Disociační kinetiky komplexu (7) a (10)	- 61 -
3.9. Srovnání formačních a disociačních kinetik komplexu (7) a (10).....	- 64 -
4. Závěr	- 66 -
5. Seznam zkratk.....	- 68 -
6. Poděkování	- 69 -
7. Použitá literatura.....	- 70 -

Kódová označení jednotlivých sloučenin jsou uvedena na **Obr.1.**



Obr.1: Kódová označení sloučenin uvedených v textu.

1. Teoretický úvod

Koordinační chemie a její sloučeniny nacházejí uplatnění nejen v různých chemických odvětvích, našly také mnohá využití i v oblastech humánní medicíny. Významné je použití koordinačních sloučenin v nukleární medicíně, a to v diagnostických i v terapeutických aplikacích. Pro tyto aplikace jsou studovány a připravovány nové ligandy pro komplexace vhodných kovových iontů.

V posledních letech jsou díky své široké paletě fyzikálních vlastností ve větší míře studovány radioizotopy mědi (např. ^{61}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu).

1.1. Nukleární medicína^[1,2,3]

Nukleární medicína je interdisciplinární lékařský obor, který se zabývá diagnostikou a léčbou chorob. Hlavním nástrojem nukleární medicíny je radioaktivní záření, které je vysíláno radioaktivními látkami (radiofarmaky).

Radiofarmaka jsou léčiva, která obsahují jeden nebo více atomů radionuklidu. Pro medicínské aplikace se volí takové izotopy, které mají vhodné vlastnosti pro dané vyšetření nebo léčbu. Mezi důležité parametry patří poločas rozpadu, energie vyzařovaných částic a charakter záření. Vhodné jsou především krátké poločasy rozpadu kvůli omezení poškození organismu ozářením. Dávka záření přiměřená pro dospělého člověka, se pohybuje v rozmezí 1–30 mCi ($1 \text{ mCi} = 3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$). Energie záření a charakter záření závisí na použité radiomedicínské metodě (jiné typy záření jsou nutné pro diagnostiku a jiné pro terapeutiku), většinou se energie záření pohybuje v rozmezí 100–300 keV. Pro medicínské uplatnění je také nutné, aby dané kovy (radioizotopy) byly pevně vázány ve sloučeninách (komplexech), ze kterých se centrální iont neuvolní do organismu. Většina volných izotopů kovů jsou pro organismus velmi toxické. Radioizotopy, které jsou nejčastěji používány v medicíně, jsou uvedeny v Tab. 1.

Radiofarmaka lze připravit v různých formách. Nejpoužívanější jsou tzv. parenterální radiofarmaka, která se nejčastěji aplikují intravenózně (pravé roztoky, koloidy nebo suspenze). Další skupinou léčiv jsou tzv. perorální radiofarmaka, aplikují se perorálně (vodné roztoky nebo želatinové tobolky), a inhalační radiofarmaka (vdechování radioaktivních plynů). Poslední skupinou jsou lokálně aplikovaná radiofarmaka (cílená terapie nádorů). Největšího uplatnění nacházejí při specifickém zobrazování orgánů, kostí a tkání především v kardiologii, neurologii a onkologii.

Tab. 1: Vybrané radioizotopy používané v medicíně^[1]

Radionuklid	Použití
¹¹ C	vyšetření mozku PET
¹⁵ O	vyšetření cévního zásobení mozku PET
¹⁸ F	vyšetření PET
³² P	diagnostika chorob kostí
⁶⁴ Cu	vyšetření PET
⁶⁷ Cu	terapeutika rakoviny
^{81m} Kr	zobrazení plic
^{99m} Tc	zobrazení srdce, plic, štítné žlázy, ledvin
¹²³ I	poruchy štítné žlázy
^{191m} Ir	vyšetření kardiovaskulární chorob

1.1.1. Radiodiagnostické metody^[1,3,4,5]

Diagnostické zobrazovací metody využívají k zobrazení orgánů a tkání různé fyzikální procesy. Nejčastěji se jedná o detekci ionizujícího záření, zejména Roentgenova a γ -záření. Tyto metody se vyznačují také tím, že vyvolávají minimální interakci záření s tkání.

Bezpochyby nejstarší a nejjednodušší vyšetřovací metodou je roentgenovské snímkování. Tato metoda využívá vysokoenergetické Roentgenovo záření o krátké vlnové délce. Záření je po průchodu pacientem zachyceno a zviditelněno na fotografické desce nebo papíře jako RTG obraz.

Další zobrazovací metodou je počítačová tomografie (CT – *Computed Tomography*). Tato zobrazovací metoda měří intenzitu úzkého svazku Roentgenova záření, které projde sledovaným objektem různými směry. Z naměřených hodnot se poté počítačovou rekonstrukcí dosáhne vytvoření třídimenzionálního obrazu.

RTG a CT metody však neposkytují vysoké rozlišení. Obecně měkké tkáně Rentgenovo záření absorbují jen velmi slabě, a proto je obtížné rozlišit zdravou měkkou tkáň od tkáně patologické.

Pokrokové diagnostické metody využívají radioaktivní rozpad radionuklidů s emisí ionizujícího γ -záření. Nejčastěji se používají γ -zářiče nebo β^+ -zářiče. Po vstupu radiofarmaka do metabolismu organismu dochází k jeho distribuci. Fyziologicky nebo patologicky se následně hromadí v orgánech (tkáních) a poté se vylučuje z těla ven. Z místa uložení radiofarmaka dochází k emisi gama záření, které je tak pronikavé, že vychází z těla ven. Vhodné scintilační detektory zachytí vyšlé záření jako distribuci radiofarmaka. Podle projekce

distribuce můžeme metody rozdělit na planární (2D zobrazení) a tomografické (3D zobrazení).

SPECT – *jednofotonová emisní počítačová tomografie* (*Single Photon Emmision Computed Tomography*) je metoda založená na sledování emise γ -záření. Nejčastěji se používá jedna nebo více scintilačních kamer, které se otáčejí kolem vyšetřovaného objektu po malých úhlových krocích. Ze série planárních scintigrafických obrazů se počítačovou rekonstrukcí dosáhne vytvoření trojrozměrného zobrazení distribuce radioindikátoru ve vyšetřované tkáni. V Tab. 2 jsou uvedeny nejpoužívanější γ -zářiče.

Další zobrazovací metodou je metoda PET – *pozitronová emisní tomografie* (*Positron Emission Tomography*). Tato metoda umožňuje na základě tomografických řezů sledovat rozložení radiofarmaka v těle zkoumaného objektu. Rozpadající se radiofarmakum, které obsahuje β^+ -zářič, produkuje pozitrony. Pozitrony ihned anihilují s elektrony za vzniku dvou γ -fotonů. Vzniklé fotony odlétají v právě opačném směru se stejnou energií 511 keV. Jejich současnou detekcí se určí přesný původ vzniku. Ze získaných koincidenčních paprsků se počítačovou rekonstrukcí vytvářejí obrazy příčných řezů. Protože pozitrony mají ve tkáních dolet v rozmezí 0,2–3,5 mm než zanihilují, je prostorové rozlišení lepší než u metody SPECT. Nevýhodou této techniky je vysoká pořizovací cena skeneru. V Tab. 2 jsou uvedeny nejběžnější pozitronové zářiče.

Tab. 2: Vybrané radionuklidy používané ve SPECT a PET^[6]

Izotop	Druh rozpadu	Poločas rozpadu	Zdroj izotopu	Použití
⁶⁷ Ga	γ	3,26 d	cyklotron, ⁶⁷ Zn(p,n) ⁶⁷ Ga	zobrazení nádorových lézí
^{99m} Tc	γ	6 h	generátor, ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc, 66 h	vyšetření mozku, ledvin
¹²³ I	γ	12 h	cyklotron, ¹²³ Te(p,n) ¹²³ I	poruchy štítné žlázy
¹¹¹ In	γ	68 h	cyklotron, ¹¹¹ Cd(p,n) ¹¹¹ In	hematologická diagnostika
²⁰¹ Tl	γ	72 h	cyklotron, ²⁰³ Tl(p,3n) ²⁰¹ Pb(EC) ²⁰¹ Tl, 9,33 h	vyšetření myokardu
¹⁵ O	β^+	2,1 min	cyklotron, ¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O	vyšetření cévního zásobení mozku
¹⁸ F	β^+	110 min	cyklotron, ¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	onkologická diagnostika
⁶⁴ Cu	β^+	12,74 h	cyklotron, ⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu	onkologická diagnostika
⁶⁸ Ga	β^+	68,1 min	cyklotron, ⁶³ Cu(p,n) ⁶⁸ Ga	studium trombózy a aterosklerózy
⁸² Rb	β^+	1,27 min	generátor, ⁸² Sr(β^-) ⁸² Rb, 25,6 d	lokalizační agents myokardu

1.1.2. Radioterapeutické metody^[1,3,4,7]

Radioterapie je fyzikálně-medicínský obor, který využívá účinků ionizujícího záření na živou tkáň. V případě dostatečně vysoké dávky dochází k usmrcování buněk, nebo alespoň k poškození jejich DNA, a tím k zamezení jejich dalšího množení. Důležitým cílem terapie je také zamezení poškození okolních zdravých tkání. Ve většině případů se jedná o léčbu nádorových onemocnění. Radiační likvidace nádorových buněk může být součástí tzv. kurativní terapie (lat. *cura* = *léčení*, úplné vyléčení nádorového onemocnění), nebo typicky v pokročilejších případech, se jedná o paliativní terapii (lat. *pallium* = *plášť*, zmírňuje a zpomaluje průběh nemoci).

Oproti diagnostickým metodám terapie používá vhodná radioterapeutika, které emitují hmotné částice s krátkým doletem (α -zářiče, β^- -zářiče, γ -zářiče s nízkou energií emitovaného záření, nebo s emisí Augerových elektronů). Léčivo bývá navrženo tak, aby bylo selektivně vychytáváno a akumulováno v nádorové tkáni. Dále je nezbytně nutné, aby poločas rozpadu použitého izotopu byl alespoň v řádu hodin (nutná doba pro zachycení z krevního oběhu v patologické tkáni).

Radioterapeutika se dělí do tří oblastí podle způsobu aplikace zářiče do cílového místa. Brachyterapie využívá aplikaci uzavřeného zapouzdřeného radioizotopu, který se zavádí přímo do nádorového ložiska nebo do jeho blízkosti. Proti tomu tzv. radioizotopová terapie využívá aplikací otevřených zářičů ve vhodné chemické formě přímo do organismu. Vlastní činidlo je selektivně distribuováno krevním řečištěm do cíleného místa. Terapie může také využívat kromě interních zdrojů radioaktivity také externí zdroje γ záření (teleterapie). Příkladem je tzv. Leksellův gama nůž, který využívá fokusaci mnoha svazků paprsků do oblasti nádoru. Zdrojem γ záření je izotop ^{60}Co (energie 1,17 a 1,33 MeV). Radionuklidy používané při terapii jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Vybrané radionuklidy používané v radioterapii

Izotop	Druh rozpadu	Poločas rozpadu	Zdroj izotopu
^{32}P	β^-	14,3 d	reaktor, $^{32}\text{S}(\text{n},\text{p})^{32}\text{P}$
^{67}Ga	γ /Auger	3,3 d	cyklotron, $^{67}\text{Zn}(\text{n},\text{p})^{67}\text{Ga}$
^{67}Cu	β^-	61,8 h	cyklotron, $^{67}\text{Zn}(\text{n},\text{p})^{67}\text{Cu}$
^{90}Y	β^-	64 h	generátor, $^{90}\text{Sr}(\beta^-)^{90}\text{Y}$, 28 let
^{131}I	β^-	8 d	reaktor, $^{130}\text{Te}(\text{n},\gamma)^{131}\text{Te} \rightarrow ^{131}\text{I}$

1.2. Měď

1.2.1. Obecné vlastnosti^[8,9,10,11]

Měď spolu se stříbrem a zlatem patří do I.B skupiny periodické tabulky prvků. Tento ušlechtilý kovový prvek načervenalé barvy je používán člověkem již od starověku. Ryzí měď se v přírodě vyskytuje vzácně. Její nejčastější podoba je ve formě sulfidů, oxidů, uhličitánů a hydroxidů. Mezi nejvýznamnější rudy patří chalkopyrit (CuFeS_2), chalkosin (Cu_2S), cuprit (Cu_2O) a malachit ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$).

Měď může mít v koordinačních sloučeninách oxidační čísla I, II, III a IV. Stabilní sloučeniny s nulovým nebo záporným oxidačním číslem nejsou známy.

Oxidační číslo III (d^8) je méně běžným stavem, neboť sloučeniny podléhají velmi snadno redukci. Komplexy je nutno stabilizovat silnými elektronegativními ligandy. Na druhou stranu se ion Cu^{III} účastní důležitých biochemických pochodů.

Oxidační číslo II (d^9) je u sloučenin mědi nejběžnější. Jednoduché měďnaté sole lze odvodit téměř od všech aniontů. U komplexů lze očekávat převážně koordinační čísla 4, 5 a 6. Pro Cu^{II} je charakteristická široká paleta sloučenin s *N*-donorovými a s *O*-donorovými ligandy.

Oxidační číslo I (d^{10}) je u většiny jednoduchých sloučenin nestálé. Tento stav je možné stabilizovat v málo rozpustných sloučeninách nebo za pomoci π -akceptorových ligandů. Komplexy jsou díky zaplněným *d* orbitalům bezbarvé nebo nažloutlé a diamagnetické.

Měď zaujímá zvláštní postavení mezi kovy, neboť je důležitým biogenním stopovým prvkem, a také kofaktorem některých enzymů (např. ceruloplasmin, glutathion, metalothionein, atd.). V lidském těle je třetím nejrozšířenějším přechodným kovem. Rovnováha mědi v organismu může být narušena v důsledku různých chorob (např. Menkeho nebo Wilsonova nemoc^[12]).

1.2.2. Izotopy mědi a jejich příprava^[13,14,15,16]

V posledních letech jsou díky existenci velkého počtu izotopů (zastoupení v rozmezí nukleonových čísel od 52 do 80), široké paletě fyzikálních (vhodné poločasy rozpadu, druh a energie emitovaného záření) a chemických vlastností (koordinační aspekty) ve větší míře studovány radioizotopy mědi. V přírodě je měď zastoupena pouze dvěma stabilními izotopy ^{63}Cu (69,2 %) a ^{65}Cu (30,8 %). Izotopy ^{57}Cu až ^{79}Cu byly připraveny uměle a některé z nich existují také v metastabilních formách. Přehled vybraných izotopů mědi je uveden v Tab. 4.

Tab. 4: Vybrané izotopy mědi^[14]

Radionuklid	$t_{1/2}$	Druh rozpadu (%)	Zdroje radionuklidu
⁶⁰ Cu	23,7 min	β^+ (93), EZ (7)	cyklotron
⁶¹ Cu	3,3 h	β^+ (62), EZ (38)	cyklotron
⁶² Cu	9,7 min	β^+ (98), EZ (2)	generátor/cyklotron
⁶³ Cu	stabilní (69,2 %)		
⁶⁴ Cu	12,7 h	β^+ (19), EZ (41), β^- (40)	reaktor/cyklotron
⁶⁵ Cu	stabilní (30,8 %)		
⁶⁶ Cu	5,1 min	β^- (100)	reaktor/cyklotron
⁶⁷ Cu	61,8 h	β^- (100)	reaktor/cyklotron

Z uvedených izotopů mědi jsou předmětem největšího zájmu radioizotopy ⁶⁴Cu a ⁶⁷Cu. Radionuklid ⁶⁴Cu je jedním z nejuniverzálnějších izotopů mědi. ^[16]Při jaderném rozpadu může dojít jak k elektronovému záchytu (41 %, následkem může dojít o k emisi Augerových elektronů), tak i k vyzáření β^- (40 %) a β^+ (19 %). Poločas rozpadu nuklidu (12,7 h) odpovídá farmakokinetice mnoha makromolekulárních nosičů a dostatečné době přípravy radiofarmaka. Izotop lze připravit v reaktorech nebo v cyklotronech. Podle požadované aktivity se volí přímá aktivace měděných terčů záchytem tepelných neutronů v reaktoru ⁶³Cu(n,γ)⁶⁴Cu. Vyšších měrných aktivit lze snadno dosáhnout nepřímou aktivací zinkových terčů ⁶⁴Zn(n,p)⁶⁴Cu. Nejvyšší aktivity jsou dosahovány v cyklotronech ozařováním obohacených niklových ⁶⁴Ni(p,n)⁶⁴Cu nebo zinkových terčů ⁶⁴Zn(d,2p)⁶⁴Cu. Připravený radioizotop ⁶⁴Cu umožňuje dlouhodobou studii při relativně nižší dávkové zátěži, proto ho lze využít ke studiím metabolismu mědi, diagnostice metabolických poruch nebo jako radioaktivní značku pro specificky cílené nosiče.

Radionuklid ⁶⁷Cu má ze všech izotopů nejdelší poločas rozpadu (61,8 h). Rozpadá se β^- přeměnou na ⁶⁷Zn v základním stavu za vyzáření elektronu (energie 577 keV) nebo na některý ze tří metastabilních izotopů (následně přejdou do základního stavu vyzářením γ fotonu o energii 92 keV nebo 185 keV). Izotop se připravuje náročnou beznosičovou metodou v reaktoru s vysokým neutronovým tokem ⁶⁷Zn(n,p)⁶⁷Cu. Připravený radioizotop ⁶⁷Cu se využívá v diagnostických metodách SPECT a k terapii nádorových onemocnění.

1.2.3. Radiochemické separace radioizotopů mědi^[17,18,19,20]

Radioizotopy připravené ozařováním kovových terčů (neutrony v jaderných reaktorech nebo protony či deutrony v cyklotronech) obsahují kromě požadovaného dceřiného izotopu také velké množství jiných kovů, které je nutné od produktu oddělit. Nejčastěji se jedná o nikl, zinek a o stopová množství kobaltu.

Pro aplikace nukleární medicíny je však velmi důležité, aby vyrobené radioizotopy byly co nejčistější a měly co nejvyšší specifickou aktivitu. Proto je nezbytně nutné tyto nečistoty oddělit od požadovaných radioizotopů pomocí vhodných separačních metod.

Separační radiochemické metody jsou velmi rozmanité. Většina dělicích metod radioizotopů je založena na stejných principech jako běžné separační a analytické metody. K dosažení požadovaného efektu je nutné brát ohledy na příslušné radiochemické aspekty (radioaktivita, poločas rozpadu, atd.). Mezi nejstarší „klasické“ metody patří krystalizace, srážení a sorpce. V některých případech jsou i v dnešní době vhodné, ale časově náročné. V moderní radiochemii nabývají stále většího významu extrakce, destilace, elektrolýza a také iontoměničová chromatografie.

Nejčastěji se používají kationtové nebo aniontové iontoměniče, a nebo chelatující pryskyřice, které mají na polymerním nosiči navázané vhodné organické měniče iontů s různými vhodně volenými aktivními skupinami. Selektivní organické měniče se nejčastěji připravují polymerací a aktivní molekuly (např. makrocyclické ligandy) se dále váží na polymerní nosič. Výměna iontů do značné míry závisí na použitém pH eluční směsi. Cílený radioizotop je poté nejčastěji z pryskyřic vytěsněn působením nadbytku silné kyseliny.

1.3. Ligandy komplexující měď^[21,22]

V klinické aplikaci jsou používány především radioizotopy těžkých kovů. Jejich užití v medicíně nese řadu komplikací. Kovy jsou ve volném stavu velmi toxické a ukládají se v různých orgánech a tkáních. Je tedy nutné, aby kovy byly vázané za podmínek *in vivo* ve stabilních komplexech. Dále nesmí docházet k jejich disociaci vlivem jiných konkurenčních ligandů (např. aminokyselin nebo proteinů). Na druhou stranu se v živém organismu nachází i řada jiných iontů (např. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} a $\text{Fe}^{2+,3+}$), které by mohly přispět k transmetalacím reakcím či konkurovat radioizotopům kovů. Je tedy nutné najít vhodné ligandy, které by splňovaly tvorbu stabilních komplexů, byly selektivní a jejich komplexy vynikaly kinetickou inertností.

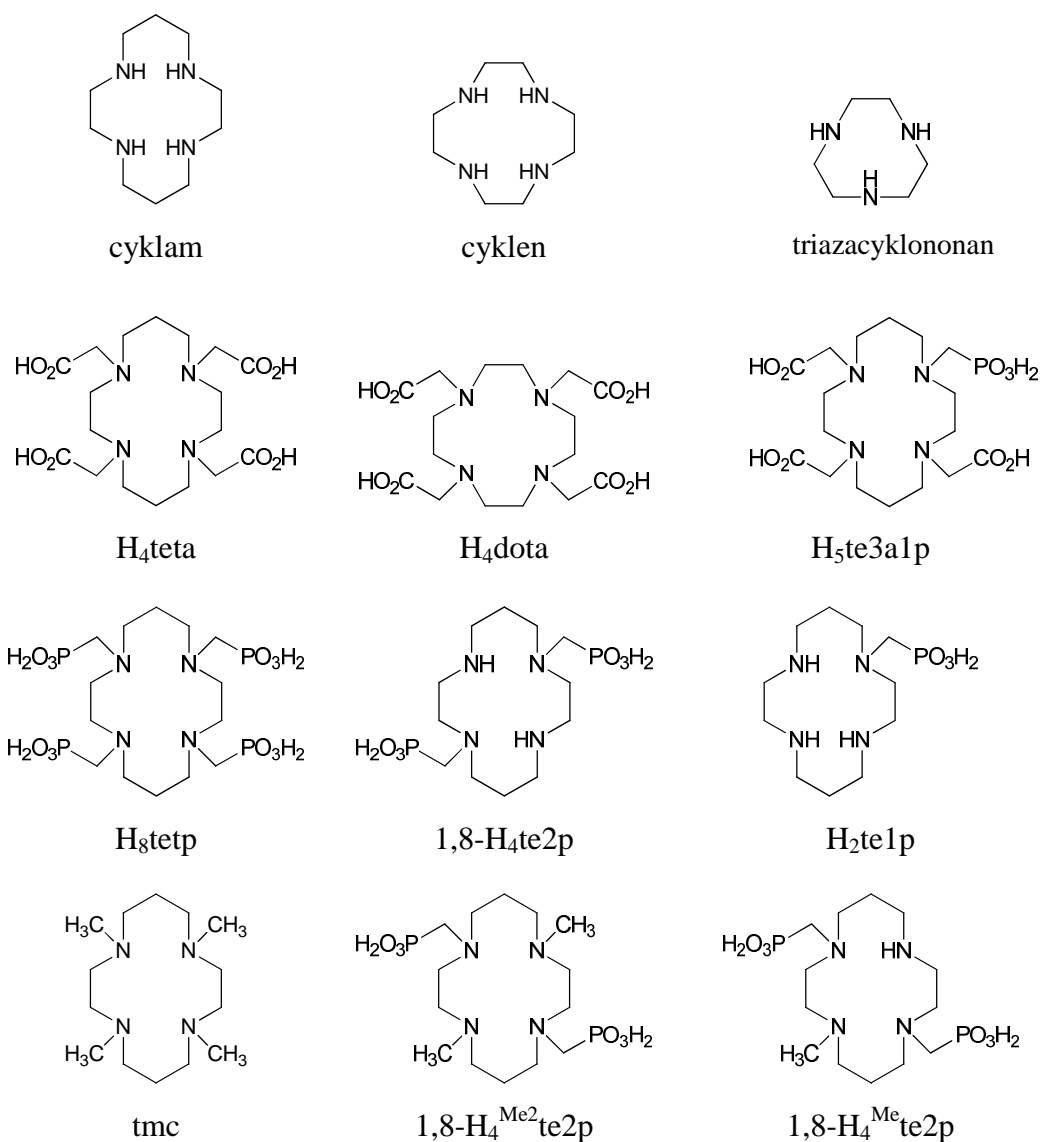
Již řadu let je předmětem stálého zkoumání syntéza a studium koordinačních vlastností dusíkatých makrocyclických ligandů (bifunkčních chelatatů). Základní skelet polyaminové

sloučeniny je většinou substituován vhodnými pendantními skupinami (substituent obsahující skupiny s koordinačními vlastnostmi). Nejvhodnějšími pendantními skupinami jsou především karboxylové kyseliny (hlavně acetátové skupiny), amidové a alkoxy deriváty, a oxokyseliny fosforu (fosfonáty a fosfináty). Obecně se dá rychlost komplexace a selektivita, kinetická inertnost a termodynamická stabilita vzniklých komplexů ovlivnit právě počtem a charakterem navázaných pendantních skupin. Důležitým parametrem je také tvar ligandů – jejich základní kostra může být jak lineární, tak i cyklická.

Jsou zkoumány různě velké makrocyclické ligandy pro různé radioizotopy (závisí na poloměru kovu a velikosti kavity základního skeletu), především tetraazamakrocycly, polyaminokarboxyláty a polyaminofosfonáty.

V současné době je předmětem největšího zájmu studium azamakrocyclických ligandů. Jako příklad lze uvést triazacyklononan, cyklen a cyklam. Triazacyklononan, cyklen a jejich deriváty jsou určeny především ke komplexaci lanthanoidů a trojmocného gallia.

V současné době je předmětem zájmu i tetraazamakrocyclický ligand cyklam, který tvoří v přítomnosti měďnatých kationtů komplex vynikající svou kinetickou inertností i za podmínek *in vivo*^[23]. Navázáním koordinujících skupin na až čtyři dusíkové atomy cyklamového skeletu získáme rozsáhlou skupinu ligandů. Používají se především polyaminokarboxyláty, polyaminofosfonáty a polyaminofosfináty. Na Obr. 2 jsou uvedeny příklady struktur polyaminokarboxylátů a polyaminofosfonátů.



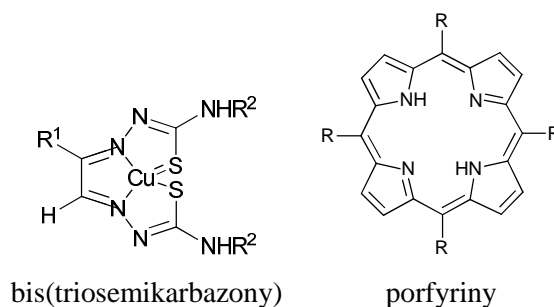
Obr. 2: Příklady struktur vybraných makrocyclických ligandů^[24].

Kromě zmíněných bifunkčních ligandů jsou pro onkologické aplikace též vhodné bis(thiosemikarbazony) s různými substituenty^[14,25] a porfyriny^[14].

Bis(thiosemikarbazony jsou látky známé především jako chemoterapeutika s výjimečným spektrem biologických účinků. S mědí tvoří termodynamicky a kineticky stálé uzavřené čtvercově planární komplexy s třemi pětičlennými chelátovými kruhy (komplexy makrocyclických ligandů jsou však obecně stálejší). Obecná struktura bis(thiosemikarbazonů) je uvedena na Obr. 3.

Porfyriny jsou organické cyklické sloučeniny, které jsou odvozené od tetrapyrrolu porfinu (látko je tvořena čtyřmi pyrrolovými jádry, která jsou spojena čtyřmi methinovými můstky^[26]). Například v lidském těle jsou nejvýznamnější hemy, hemoglobiny, myoglobiny a

cytochromy. Tato skupina makromolekul má schopnost komplexovat různé kovy a lze je považovat za potenciálně vhodné nosiče radioizotopů mědi. Základní skelet sloučenin lze velmi snadno derivatizovat (úprava rychlosti komplexace, selektivita) za účelem vytvoření neobyčejně stálých komplexů, které jsou odolné vůči disociaci. Dále mají schopnost se kumulovat v zánětlivých a lymfatických tkáních a lze je tedy využít v zobrazovacích metodách. Obecný tvar porfyrinů je uveden na Obr. 3.



Obr. 3: Obecná struktura bis(thiosemikarbazonů) a porfyrinů.

1.4. Teoretické pozadí diplomové práce

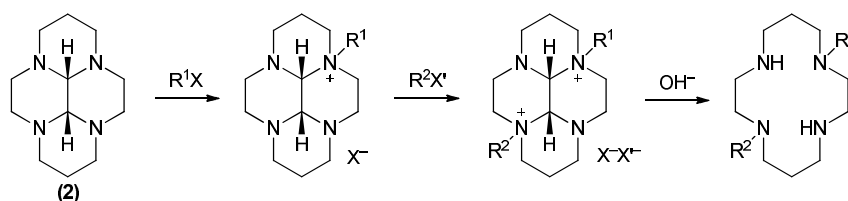
Jak již bylo nastíněno v teoretickém úvodu, tato diplomová práce je zaměřena především na design, syntézu a studium vlastností vhodných makrocyclických bifunkčních ligandů, které by měly selektivně komplexovat připravené radioizotopy mědi. Současně by měly být ligandy navázány kovalentní vazbou ke specificky navrženému makromolekulárnímu nosiči. Takto připravený iontoměnič nebo chelatující pryskyřice by našla využití při medicínské radioseparaci izotopů mědi, které by byly určeny pro přípravu radiofarmak.

V naší pracovní skupině byla dříve studována sloučenina 1,8-H₄^{Me2}te2p (Obr. 2)^[24]. Bylo zjištěno, že tento makrocyclický ligand vykazuje vhodné vlastnosti pro selektivní separaci mědi. Námi připravené analogické ligandy by měly vykazovat vysokou selektivitu komplexace mědi (během přípravy radioizotopů vznikají i jiné nečistoty a kovy). Dále vzniklý komplex musí být málo kineticky inertní, aby bylo možné Cu²⁺ z iontoměniče (chelatuující pryskyřice) snadno a rychle uvolnit.

Pro přípravu 1,8-regioizomerů^[27] je nutné aplikovat chránění v poloze 1,8. Už v bakalářské práci byly studovány bifunkční chelatanty, které se daly velmi elegantně připravit chráněním dusíkatých atomů. Výchozí látkou celé syntetické cesty byl bis(aminal) cyklamu se dvěma methylenovými můstky^[28,29,30,31]. V diplomové práci byl použit jeho analog *cis*-bis(aminal) cyklamu s glyoxalovým můstkem^[39,40]. Použití tohoto derivátu cyklamu nabízí mnoho výhod, neboť alkylace je vysoce regioselektivní.

Bis-kvarternizace je ze sterických a nábojových důvodů možná pouze do polohy *trans*. Dále látka (2) vykazuje velký rozdíl v reaktivitě do prvního a druhého stupně za vzniku monosubstituovaných a disubstituovaných derivátů. Odštěpení glyoxal-bis(aminalového) můstku se provádí u monosubstituovaného derivátu hydroxylaminem v bezvodém ethanolu a u disubstituovaného derivátu vodným roztokem hydroxidu sodného nebo roztokem hydroxidu lithného v methanolu^[32,33]. Reakční schéma přípravy 1,8-disubstituovaných cyklamů je uvedeno na Schéma 1.

Schéma 1: Reakční sekvence vzniku 1,8-disubstituovaných cyklamů

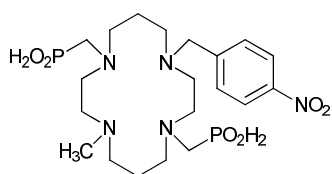


Bylo zjištěno, že navázání koordinujících pendantních skupin zvyšuje rychlost komplexace. Navázané pendantní skupiny nesou záporný náboj, který kompenzuje kladný náboj kovového iontu a protonizovaných aminoskupin. Další výhodou pro tuto práci je, že u plně substituovaného cyklamu dochází ke snížení kinetické inertnosti vzniklých komplexů. Byla zvolena methylfosfinátová a methylfosfonátová pendantní ramena, která by měly mít spolu se základním cyklickým dusíkatým skeletem velkou afinitu k mědi. Methylový substituent je navázán z důvodu obsazení dusíkového atomu na cyklamu (vzhledem ke zvolenému pořadí reakčních kroků je třeba tento dusíkový atom ochránit před substitucí koordinující skupinou). Poslední dusíkový atom je obsazen aminobenzylem, který by měl mít vhodné vlastnosti k navázání celé makrocyclické sloučeniny pomocí sulfoamidové či jiné vazby k požadovanému makromolekulárnímu nosiči.

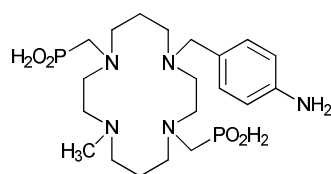
1.5. Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce je:

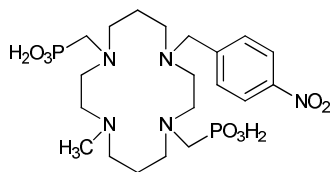
- Příprava látek **(9)** a **(6)** ve vhodných formách, aby mohly být použity pro další syntézu
- Příprava cílových ligandů **(7)** a **(10)**
- Studium termodynamických vlastností komplexů s ligandy **(7)** a **(10)**
- Studium formačních a disociačních kinetik komplexů s ligandy **(7)** a **(10)**



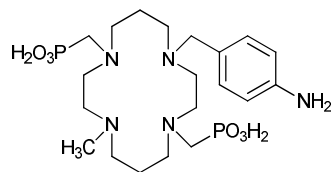
(6)



(7)



(9)



(10)

2. Experimentální část

2.1. Seznam použitých chemikálií

Paraformaldehyd byl získán filtrací starých vodných roztoků formaldehydu (Lachema) a byl sušen v exsikátoru nad H_2SO_4 . Bezvodý acetonitril byl připraven destilací komerčního acetonitrilu (Penta) s oxidem fosforečným^[34]. Ostatní chemikálie byly získány z komerčních zdrojů od firem Sigma-Aldrich, Fluka, Penta a Lachema.

2.2. Metody charakterizace

2.2.1. Nukleární magnetická rezonance (NMR)^[35]

Měření spekter ^1H , ^{13}C a ^{31}P bylo provedeno na přístrojích VNMR300 (rezonanční frekvence jader ^1H : 299,94, ^{13}C : 75,4 a ^{31}P : 121,4 MHz) a Bruker Avance (III) 600 (rezonanční frekvence jader ^1H : 600,17, ^{13}C : 150,9 a ^{31}P : 242,9 MHz). Výše zmíněné spektrometry jsou dostupné na PřF UK. Všechny níže uvedené hodnoty chemických posunů δ jsou uvedeny v jednotkách ppm. Jsou uváděny s přesností na dvě desetinná místa pro ^1H , a na jedno desetinné místo pro ^{13}C a ^{31}P . Chemické posuny v ^1H a ^{13}C NMR spektru byly referencovány na interní standardy *terc.* butanol ($\delta_{\text{H}} = 1,24$, $\delta_{\text{C}} = 30,29$) a tetramethylsilan ($\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0$). Interakční konstanty J jsou uváděny v Hz a jsou zapsány s přesností na jedno desetinné místo pro ^1H , a na jednotky pro ^{13}C a ^{31}P . Použitá deuterovaná rozpouštědla: CDCl_3 , 99,8 % (Aldrich), DMSO-d_6 , 99,8 % (Chemotrade), D_2O , 99,95 % (Chemotrade) a NaOD (připravený reakcí $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}$). Symboly použité v NMR charakterizacích: s (singlet), d (dublet), td (triplet dubletu) a m (multiplet). Spektra byla měřena Bc. Terezou Krchovou a Mgr. Tomášem Davidem. Charakterizace jsou uvedeny u příslušných látek v syntetické části.

2.2.2. Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena na přístroji Bruker ESQUIRE 300 (dostupný na PřF UK). Hmotnostní spektrometr umožňuje ionizaci elektrosprejem a je vybaven iontovou pastí. Byla získána spektra kladných a záporných iontů. Data byla naměřena Bc. Janem Blahutem, Mgr. Miroslavem Pniokem a RNDr. Vojtěchem Kubíčkem, Ph.D. Charakterizace jsou uvedeny u příslušných látek v syntetické části.

2.2.3. Rentgenová strukturní analýza

Difrakční data byla získána na přístroji Enraf-Nonius KappaCCD (dostupný na PřF UK). Krystalové struktury byly vyřešeny RNDr. Ivanou Císařovou, CSc. Závěrečné vypřesnění krystalografických struktur provedl školitel doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D. Rentgenové struktury látek jsou uvedeny v části Výsledky a diskuse. Krystalografická data jsou uvedena u příslušných látek v syntetické části.

2.2.4. Tenkovrstvá, sloupcová a iontoměničová chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla provedena na destičkách Merck TLC (silica gel 60 F₂₅₄ plates). Mobilní fáze a retenční faktory jsou uvedeny u příslušných látek v syntetické části. Detekce byla realizována vizuální detekcí UV lampou – MINERALIGHT® LAMP, sprejováním 0,5% ethanolickým roztokem ninhydrinu a následným zahřátím, nebo ponořením do 5% vodného roztoku modré skalice (CuSO₄·5H₂O).

Sloupcová chromatografie byla provedena na kolonách silikagelu (Silica gel 60 Merck). Mobilní fáze (IPAV isopropanol:amoniak:voda, EtOH:NH₃) jsou uvedeny u jednotlivých purifikačních kroků v syntetické části.

Iontoměničová chromatografie byla provedena na silném/slabém kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh; Amberlite CG 50/H AR 200–400 mesh). Eluční směsi jsou uvedeny u jednotlivých purifikačních kroků v syntetické části.

2.2.5. Elementární analýza

Obsah uhlíku, vodíku, dusíku, bromu a jodu byl stanoven Zuzanou Kálalovou a Ivanou Strašlipkovou v Ústavu makromolekulární chemie AVČR v Praze na automatickém analyzátoru Perkin Elmer CHN/S Elemental analyser 2400 II. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech u příslušných látek v syntetické části.

2.2.6. Spektrofotometrická měření

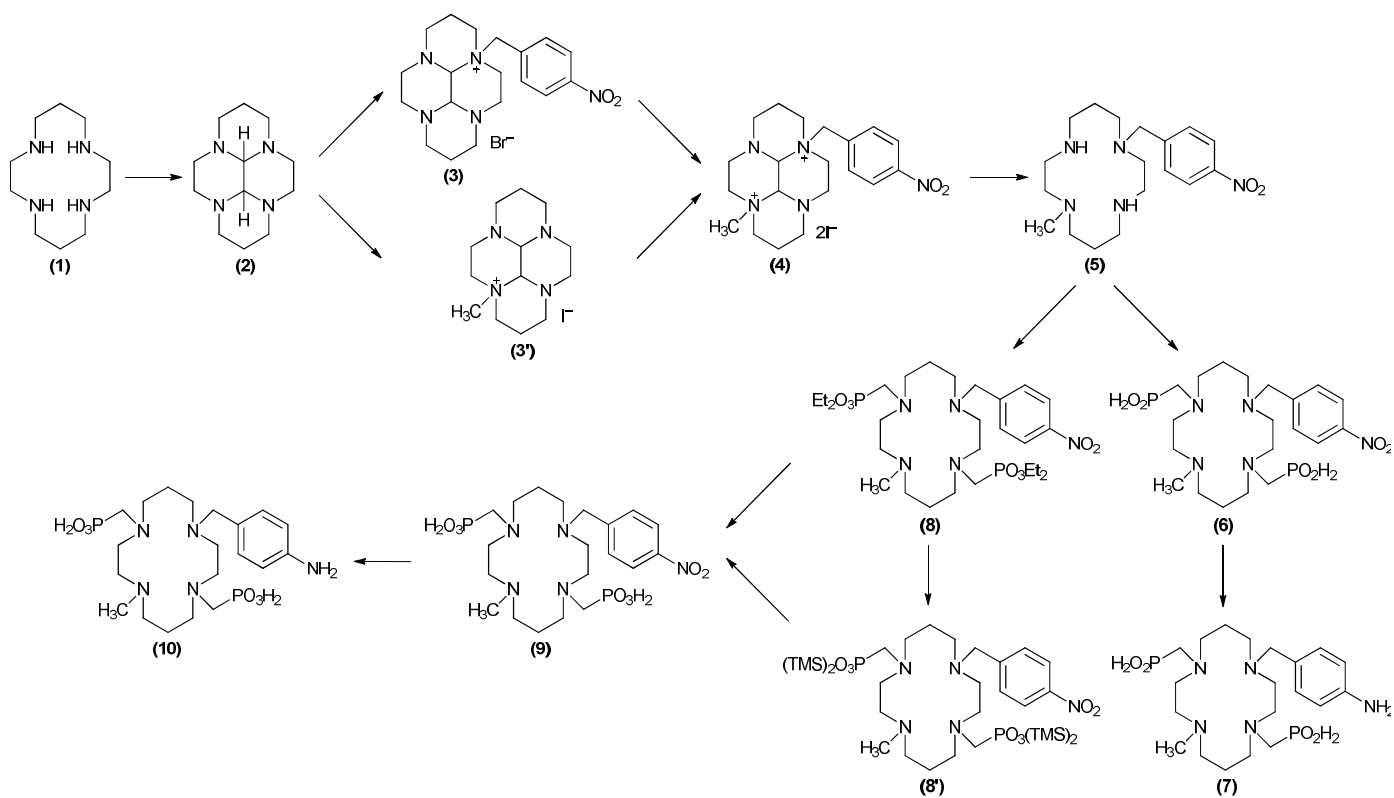
Měření formačních a disociačních kinetik bylo prováděno na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC (přístroj dostupný na PřF UK) s teplotou regulovanou Peltierovým článkem při teplotě 25–55 ± 0,05 °C.

Speciální měření formačních kinetik (v rozmezí pH 4,5–7) bylo provedeno na přístroji Stopped-flow reakční analyzátor SX.18MV v Ústavu anorganické chemie AVČR v Řeži.

2.3. Schéma syntézy

Hlavním cílem diplomové práce je syntéza ligandů **(7)** a **(10)**. Schéma syntézy je uvedeno níže (Schéma 2).

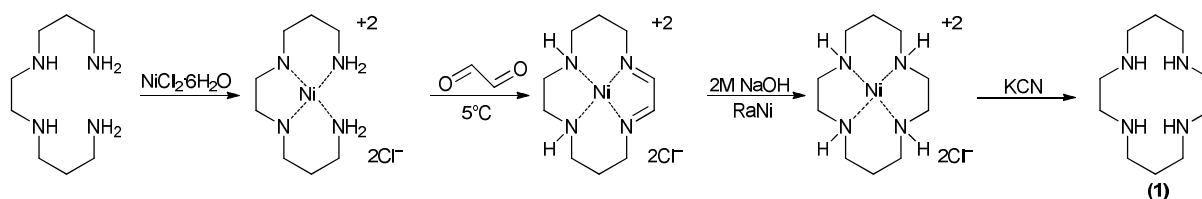
Schéma 2: Navržené schéma syntézy ligandů



2.4. Syntéza výchozích látek

2.4.1. Příprava cyklam (1) [36,37,38]

Cyklam (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan) (**1**) byl připraven podle optimalizovaného postupu^[38].



Bis(3-aminopropyl)-1,2-ethylenediamin (3,2,3-amin) (20,0 g, 110 mmol) byl převeden do 2dm^3 kádinky, poté byl rozpuštěn v 500 ml destilované vody a za stálého míchání byl přidán $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (27,3 g, 110 mmol). Kádinka se vzniklým intenzivně fialovým roztokem byla ponořena do ledové tříště a chlazena na méně než 5°C .

Trimer glyoxalhydrátu (12,0 g, 57 mmol) byl smíchán se 120 ml destilované vody. Vzniklá suspenze byla zahřívána a míchána při 65°C do úplného rozpuštění. K intenzivně fialovému roztoku nikelnatého komplexu byl přikapáván (Pasteurovou pipetou) připravený horký roztok monomerního glyoxalu. Směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě.

Druhý den byl k reakční směsi přidán NaOH (2M, 500 ml vodného roztoku). K takto připravenému roztoku byl za stálého intenzivního míchání přidáván po částech Raneyův nikl (RaNi , 25,0 g). Získaná suspenze byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla přefiltrována přes vlhkou papírovou kaši (připravena rozmícháním kousků buničiny v destilované vodě) na fritě S2. K filtrátu byl přidán KCN (50,0 g, 770 mmol). Směs byla přelita do 2dm^3 baňky s kulatým dnem a refluxována pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl vzniklý cyklam extrahován chloroformem (1dm^3). Extrakt byl vysušen Na_2SO_4 a zahuštěn na RVO na takový objem, aby docházelo ke krystalizaci produktu. Zahuštěný produkt byl přelit nadbytkem MeCN (trojnásobek objemu suspenze). Vzniklá bílá kaše cyklam (1) byla odsáta na fritě S3, promyta MeCN a sušena proudem vzduchu 1 hodinu. Vzniklý bílý prášek byl přes noc dosušen v evakuovaném exsikátoru nad KOH . Hmotnost cyklam (1) po vysušení činila 5,20 g (22 %).

Charakterizace látky (1):

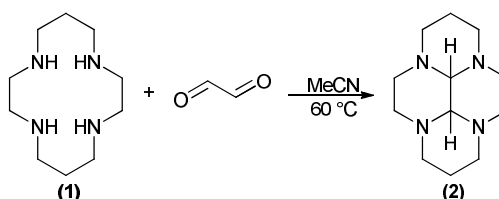
TLC: mobilní fáze: IPAV (5:1:1), $R_f = 0,00$ (ninhydrin: fialová skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle fialová skvrna)

MS: (+): 200,8 ($[M+H]^+$, teor. 201,2)

^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ = 1,71 (p, $^3J_{\text{HH}}$ = 5,1, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,69 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5,1, 8H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,71 (s, 8H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75,4 MHz, CDCl_3): δ = 32,15 (s, 2C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 48,48 (s, 4C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 51,22 (s, 4C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$)

2.4.2. Příprava *cis*-bis(aminalu) cyklamů s glyoxalovým můstkem (2)^[39,40]



Do litrové kulaté baňky s vloženým míchadlem byl navážen cyklam (1) (10,0 g, 50,0 mmol). Poté bylo přidáno 400 ml acetonitrilu. Následně byla baňka umístěna do olejové lázně vyhřáté na 60 °C a vzniklá suspenze byla intenzivně míchána.

Do 100ml kádinky byl navážen trimer glyoxalhydrátu (4,6 g, 22,0 mmol, 1,3 ekv.). Bylo přidáno 50 ml destilované vody a vzniklá suspenze byla míchána a zahřívána na topné míchačce při teplotě 80 °C až do úplného rozpuštění.

Vzniklý horký roztok monomerního glyoxalu byl pomalu přikapáván (Pasteurovou pipetou) k míchané suspenzi (cyklam/acetonitril). Vzniklá směs byla míchána hodinu při teplotě 60 °C (do úplného rozpuštění cyklamů). Poté byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce (RVO). K odparku bylo přidáno 50 ml toluenu a směs byla opět odpařena na RVO do sucha. Vzniklý produkt byl extrahován (4x 250 ml vroucího hexanu), extrakt přefiltrován přes skládaný filtrační papír a zahuštěn na RVO. Vzniklý bezbarvý olej (2) byl umístěn do evakuovaného exsikátoru nad NaOH přes noc. Byl získán *cis*-bis(aminal) cyklam s glyoxalovým můstkem (2) ve formě bílého prášku, jeho hmotnost činila 8,4 g (76 % na výchozí cyklam (1)).

Charakterizace látky (2):

TLC: mobilní fáze: IPAV (7:3:3), R_f = 0,85 (ninhydrin: fialová skvrna)

MS (+): 222,8 ($[M+H]^+$, teor. 223,2)

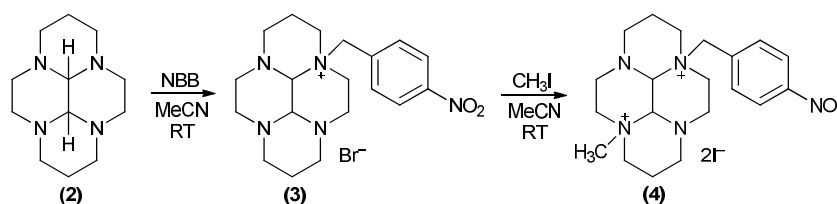
^1H NMR (600,2 MHz, D_2O): δ = 1,35–1,47 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,24–2,38 (m, 4H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,42 (d, 2H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $^3J_{\text{HH}}$ = 12,0 Hz), 2,73 (d, 2H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $^3J_{\text{HH}}$ = 12,0 Hz)

$\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$, $^3J_{\text{HH}} = 12,0 \text{ Hz}$); 2,90–3,05 (m, 4H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$); 3,11 (s, 2H, N--CH--N); 3,34 (td, 4H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $^3J_{\text{HH}} = 12,0 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{HH}} = 3,0 \text{ Hz}$)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): $\delta = 19,4$ (s, 2C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 44,3 (s, 2C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 51,8 (s, 2C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 53,6 (s, 2C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$); 55,6 (s, 2C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$); 76,2 (s, 2C, N--CH--N)

2.5. Syntéza a hydrolýza kvarterních solí

2.5.1. Příprava látky (4) přes meziprodukt (3)



Bis(aminal) cyklamů s glyoxalovým můstkem (**2**) (5,5 g, 25,7 mmol) byl navážen do 250ml kulaté baňky a následně rozpuštěn ve 100 ml bezvodého acetonitrilu. K tomuto roztoku byl za stálého míchání přisypán nadbytek *p*-nitrobenzylbromidu (NBB, 7,3 g, 34,0 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána 2 dny při laboratorní teplotě. Po dvou dnech míchání byla vzniklá sraženina přefiltrována na fritě S4, několikrát promyta bezvodým acetonitrem a usušena ve vakuovém exsikátoru nad KOH. Byl získán světle žlutý produkt (**3**), jeho hmotnost činila 10,0 g (93 % na výchozí látku (**2**)).

Monokvarterní sůl (**3**) (10,0 g, 21,9 mmol) byla navážena do 250ml kulaté baňky. Do baňky bylo přilito 100 ml bezvodého acetonitrilu a vzniklá suspenze byla intenzivně míchána. Po chvíli míchání byl k reakční směsi přidán nadbytek methyljodidu (10,4 g, 73,3 mmol, 3,2 ekv.). Reakční směs byla míchána týden při laboratorní teplotě. Poté bylo opět přidáno stejné množství alkylačního činidla (CH_3I , 10,4 g, 73,3 mmol, 3,2 ekv.) a směs byla ponechána míchána další týden při laboratorní teplotě. Pak byl vzniklý produkt (**4**) přefiltrován na fritě S4 a několikrát promyt bezvodým acetonitrem a usušen ve vakuovém exsikátoru nad KOH. Suchý žlutý prášek surové biskvarterní sole (**4**) byl nasypán do 250ml Erlenmeyerovy baňky a následně rozpuštěn v malém množství horké destilované vody. Baňka byla potom umístěna do velké kádinky s ethanolem a produkt byl ponechán krystalizovat difúzí EtOH přes plynnou fázi. Byly získány žluté krystaly látky (**4**), jejichž hmotnost činila 12,0 g (84 % na výchozí látku (**3**)). Byl vybrán reprezentativní monokrystal na rentgenostrukturní analýzu (obrázek struktury je uveden v kapitole 3).

Charakterizace látky (3):

TLC: mobilní fáze: EtOH:NH₃ (1:1), $R_f = 0,65$ (ninhydrin: fialová skvrna)

MS (+): 358,0 ([M–Br]⁺, teor. 358,2)

¹H NMR (600,2 MHz, DMSO): $\delta = 1,25\text{--}1,67$ (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,03–3,16 (m, 8H, CH₂–CH₂–CH₂); 3,33 (s, 2H, N–CH₂–arom.); 3,47–4,24 (m, 8H, N–CH₂–CH₂–N); 4,96 (d, 1H, ³ $J_{\text{HH}} = 12,0$ Hz, N–CH–N); 5,40 (d, 1H, ³ $J_{\text{HH}} = 13,2$ Hz, N–CH–N); 7,86 (d, 2H, ³ $J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, arom.); 8,34 (d, 2H, ³ $J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, arom.)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, DMSO): $\delta = 18,6, 18,7$ (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 42,1, 46,0, 48,3, 51,8 (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 52,45, 53,6, 53,7, 59,1 (s, po 1C, N–CH₂–CH₂–N); 59,2 (s, 1C, N–CH₂–arom.); 69,1 (s, 1C, N–CH–N); 82,2 (s, 1C, N–CH–N); 123,8 (s, 2C, arom.); 134,4 (s, 2C, arom.); 134,9 (s, 1C, arom.); 148,6 (s, 1C, arom.)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) C₁₉H₂₈BrN₅O₂·H₂O: C 50,43 (50,00), H 6,25 (6,44), N 15,02 (15,35), Br 19,48 (17,86)

Charakterizace látky (4):

TLC: mobilní fáze: EtOH:NH₃ (5:1), $R_f = 0,05$ (ninhydrin: tmavě fialová skvrna)

MS (+): 372,8 ([M–2I]⁺, teor. 373,3)

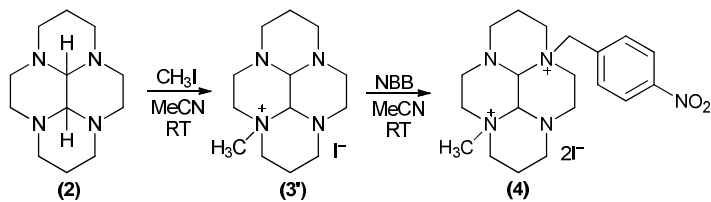
¹H NMR (600,2 MHz, DMSO): $\delta = 1,75\text{--}1,89$ (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,86–3,64 (m, 12H, CH₂–CH₂–CH₂, N–CH₂–CH₂–N); 3,68 (s, 3H, N–CH₃); 4,29–4,37 (m, 4H, N–CH₂–CH₂–N); 4,91 (s, 2H, N–CH₂–arom.); 4,91 (d, 1H, ³ $J_{\text{HH}} = 13,8$ Hz, N–CH–N); 5,06 (d, 1H, ³ $J_{\text{HH}} = 13,2$ Hz, N–CH–N); 7,86 (d, 2H, ³ $J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, arom.); 8,34 (d, 2H, ³ $J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, arom.)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, DMSO): $\delta = 18,5, 18,7$ (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 39,2, 46,2, 46,4, 49,2 (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 50,7 (s, 1C, N–CH₃); 50,9, 59,6, 60,1, 63,7 (s, po 1C, N–CH₂–CH₂–N); 63,8 (s, 1C, N–CH₂–arom.); 74,9 (s, 1C, N–CH–N); 75,1 (s, 1C, N–CH–N); 123,8 (s, 2C, arom.); 132,9 (s, 2C, arom.); 135,0 (s, 1C, arom.); 148,7 (s, 1C, arom.)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) C₂₀H₃₁I₂N₅O₂·H₂O: C 37,47 (37,22), H 4,91 (5,15), N 10,76 (10,85), I 38,58 (39,33)

Rentgenová struktura: C₂₀H₃₁I₂N₅O₂·H₂O, $M_r = 627,30$, monoklinická soustava, $P2_1/c$, $a = 12,397$ Å, $b = 19,164$ Å, $c = 10,930$ Å, $\beta = 97,30^\circ$, $V = 2573,0$ Å³, $Z = 4$, $R_1(I > 2\sigma(I)) = 0,027$, $wR_2 = 0,059$

2.5.2. Pokus o přípravu látky (4) přes meziprodukt (3')



Bis(aminal) cyklamů s glyoxalovým můstkem (**2**) (1,0 g, 4,5 mmol) byl navážen do 25ml kulaté baňky a následně rozpuštěn v 10 ml bezvodého acetonitrilu. K tomuto roztoku byl za stálého míchání přilít methyljodid (0,6 g, 4,5 mmol, 1 ekv.). Reakční směs byla míchána 20 minut při laboratorní teplotě. Po 20 minutách míchání byla vzniklá sraženina přefiltrována na fritě S4 a několikrát promyta bezvodým acetonitrem a usušena ve vakuovém exsikátoru nad KOH. Byl získán bílý produkt (**3'**), jehož hmotnost činila 1,0 g (64 % na výchozí látku (**2**)).

Monokvarterní sůl (**3'**) (1,0 g, 2,7 mmol) byla navážena do 50ml kulaté baňky. Do baňky bylo přilito 15 ml bezvodého acetonitrilu a vzniklá suspenze byla intenzivně míchána. Po chvíli míchání byl k reakční směsi přidán nadbytek *p*-nitrobenzylbromidu (NBB, 1,0 g, 4,7 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána týden při laboratorní teplotě. Po týdnu míchání byla vzniklá sraženina přefiltrována na fritě S4, několikrát promyta bezvodým acetonitrem a usušena ve vakuovém exsikátoru nad KOH. Z NMR spekter bylo zjištěno, že výše popsaná reakce neproběhla (byla izolována čistá výchozí látka (**3'**)).

Reakce byla následně zkoušena v jiném rozpouštědle. Monokvarterní sůl (**3'**) (1,0 g, 2,7 mmol) byla navážena do 50ml kulaté baňky. Do baňky bylo přilito 15 ml bezvodého dimethylformamidu (DMF) a vzniklá suspenze byla intenzivně míchána. Po chvíli míchání byl k reakční směsi přidán nadbytek *p*-nitrobenzylbromidu (NBB, 1,0 g, 4,7 mmol, 1,5 ekv.). Reakční směs byla míchána týden při laboratorní teplotě. Po týdnu míchání byla vzniklá sraženina přefiltrována na fritě S4, několikrát promyta bezvodým DMF a usušena ve vakuovém exsikátoru nad KOH. Z NMR spekter bylo opět zjištěno, že výše popsaná reakce neprobíhá.

Poznámka: Látka (**3'**) byla také připravena reakcí bis(aminalu) cyklamenu s glyoxalovým můstkem (**2**) v toluenu. Látka (**2**) (1,0 g, 4,5 mmol) byla navážena do 50ml kulaté baňky a následně rozpuštěna ve 20 ml bezvodého toluenu. K tomuto roztoku byl za stálého míchání přilít nadbytek methyljodidu (0,7 g, 4,5 mmol, 1,2 ekv.). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Po 14 dnech míchání byla vzniklá sraženina přefiltrována na fritě S4,

několikrát promyta bezvodým toluenem a dosušena ve vakuovém exsikátoru nad KOH. Byl získán bílý prášek (**3'**), jehož hmotnost činila 1,4 g (88 % na výchozí látku (**2**)).

Charakterizace látky (**3'**):

TLC: mobilní fáze: EtOH:NH₃ (1:1), $R_f = 0,20$ (ninhydrin: světle fialová skvrna)

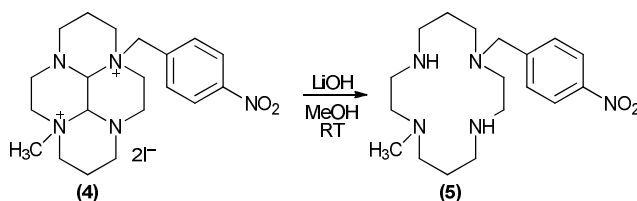
MS (+): 236,9 ($[M-I]^+$, teor. 237,2)

¹H NMR (600,2 MHz, D₂O): $\delta = 1,42\text{--}1,45$ (m, 2H, CH₂–CH₂–CH₂); 1,85–1,89 (m, 2H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,22–2,37 (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,42–2,55 (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,92–3,05 (m, 4H, N–CH₂–CH₂–N); 3,06–3,13 (m, 4H, N–CH₂–CH₂–N); 3,34 (s, 3H, N–CH₃); 3,48 (d, 1H, ³J_{HH} = 13,2 Hz, N–CH–N); 3,68 (d, 1H, ³J_{HH} = 12,6 Hz, N–CH–N)

³C{¹H} NMR (150,9 MHz, D₂O): $\delta = 18,9, 19,6$ (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 43,0 (s, 1C, N–CH₃); 46,8, 49,0, 51,6, 52,4, (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 53,3, 54,2, 65,0, 69,8 (s, po 1C, N–CH₂–CH₂–N); 83,7 (s, 1C, N–CH–N); 91,4 (s, 1C, N–CH–N)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) C₁₃H₂₅IN₄·1/3H₂O: C 43,24 (42,17), H 7,08 (6,99), N 15,04 (15,13), I 33,28 (34,27)

2.5.3. Příprava látky (**5**)



Biskvarterní sůl (**4**) (7,0 g, 11,1 mmol) byla navážena s hydroxidem lithným (5,0 g, 0,12 mol, 10 ekv.) do 500ml baňky s kulatým dnem. Ke směsi výchozí látky (**4**) a hydroxidu lithného bylo přilito 200 ml methanolu a směs byla míchána 2 dny při laboratorní teplotě.

Poté byla reakční směs odpařena do sucha na RVO. K odparku bylo přidáno 200 ml destilované vody. Vysrážený produkt (**5**) byl následně extrahován do dichlormethanu (4x 300 ml) a následně odpařen do sucha na RVO. Žlutohnědý olej (**5**) byl ještě jednou rozpuštěn v dichlormethanu a vzniklý roztok byl přefiltrován přes fritu S4. Filtrát byl opět odpařen do sucha na RVO a žlutohnědý olej (**5**) byl zbaven zbytkových rozpouštědel ve vakuu. Byla získána žlutohnědá látka (**5**), jejíž hmotnost činila 4,0 g (94 %) na výchozí látku (**4**).

Bylo odebráno 50 mg žlutohnědé látky (**5**), která byla následně rozpuštěna

v dichlormethanu a roztok byl ponechán krystalizovat difúzí hexanu přes plynnou fázi.

Poznámka: Nejprve byla snaha připravit látku (**5**) jinou syntetickou cestou. Biskvarterní sůl (**4**) (1,0 g, 1,6 mmol) byla za horka rozpuštěna v 10 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo za stálého míchání přidáno 15 ml 20% roztoku hydroxidu sodného. Vzniklá reakční směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Volná báze (**5**) byla následně extrahována do chloroformu (3x 100 ml) a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Takto připravená látka (**5**) byla poté purifikována na silikagelovém sloupci (80 ml) a eluována směsí ethanolu a amoniaku v poměru 5:1 (nečistota $R_f = 0,83$, ninhydrin: tmavě žlutá skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle žlutá skvrna). Tímto způsobem se nepodařilo připravit úplně čistou látku (**5**) a navíc výtěžky reakce byly nízké (52% výtěžek na výchozí látku (**4**)).

Charakterizace látky (**5**):

TLC: mobilní fáze: EtOH:NH₃ (5:1), $R_f = 0,64$ (ninhydrin: tmavě fialová skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle fialová skvrna)

MS (+): 350,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 350,3)

¹H NMR (600,2 MHz, CDCl₃): $\delta = 1,19\text{--}1,24$ (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 1,69 (s, 1H, CH₂–NH–CH₂); 1,85 (s, 1H, CH₂–NH–CH₂); 2,31 (s, 3H, N–CH₃); 2,40–2,50 (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,54–2,60 (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,61–2,65 (m, 4H, N–CH₂–CH₂–N); 2,68–2,76 (m, 4H, N–CH₂–CH₂–N); 3,59 (s, 2H, N–CH₂–arom.); 7,49 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz); 8,11 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz)

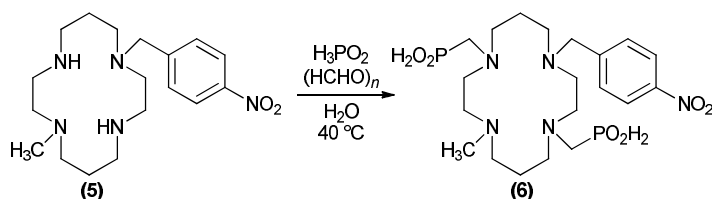
¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, CDCl₃): $\delta = 25,9, 26,0$ (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 29,8 (s, 1C, N–CH₃); 43,1, 47,5, 47,6, 49,7 (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 51,5, 53,3, 54,6, 58,0 (s, po 1C, N–CH₂–CH₂–N); 58,4 (s, 1C, N–CH₂–arom.); 123,5 (s, 2C, arom.); 129,4 (s, 2C, arom.); 147,0 (s, 1C, arom.); 147,2 (s, 1C, arom.)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) C₁₈H₃₁N₅O₂·1/3H₂O: C 60,87 (60,82), H 9,25 (9,00), N 19,32 (19,70)

Rentgenová struktura: C₁₈H₃₁N₅O₂, $M_r = 349,48$, kosočtverečná soustava, $P2_12_12_1$, $a = 9,098$ Å, $b = 9,782$ Å, $c = 21,921$ Å, $V = 1951,0$ Å³, $Z = 4$, $R_1(I > 2\sigma(I)) = 0,080$, $wR_2 = 0,059$

2.6. Navázání fosfinátových pendantních ramen a příprava ligandu (7)

2.6.1. Příprava látky (6)



Látka (5) (2,0 g, 5,7 mmol) byla navážena do 100ml kulaté baňky s míchadlem. Následně byl přilít roztok kyseliny fosforené (7,5 g, 0,11 mol, 20 ekv.) ve 20 ml destilované vody. Takto připravená baňka byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na 40°C . Po chvíli míchání byl přisypán paraformaldehyd (0,6 g, 3 ekv.). Na baňku bylo nasazeno septum a reakční směs byla míchána na olejové lázni 5 dní při teplotě 40°C (při vyšších teplotách dochází k rozkladu kyseliny fosforené a adici P–H vazby produktu na formaldehyd za vzniku produktu s hydroxymethylfosfinátovou pendantní skupinou).

Po ochlazení byl vzniklý roztok přefiltrován přes jemný filtr a světle žlutý roztok byl zahuštěn na RVO. Takto připravený roztok byl nanesen na kolonu se silným kationtovým iontoměničem (Dowex 50, 50–100 mesh, 2x20 cm) v H^+ -cyklu. Kolona byla vyplachována velkým množstvím destilované vody (asi 1,5 l). Produkt (6) byl z kolony eluován směsí kyseliny chlorovodíkové a vody v poměru 1:1 a byl následně odpařen na RVO (teplota lázně 50°C) jako hydrochlorid látky (6). Byl získán žlutý olej (6), jeho hmotnost činila 2,6 g.

Charakterizace látky (6):

TLC: mobilní fáze: IPAV (5:1:1), $R_f = 0,45$ (ninhydrin: světle fialová skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle modrá skvrna)

MS (+): 506,9 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 506,2); (–): 504,7 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, teor. 504,2)

^1H NMR (600,2 MHz, D_2O + NaOH): $\delta = 1,72\text{--}1,76$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,28 (s, 3H, N– CH_3); 2,56–2,89 (m, 16H, N– $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 3,80 (s, 2H, N– $\text{CH}_2\text{--arom.}$); 7,00 (d, 1H, N– $\text{CH}_2\text{--PO}_2\text{H}$, $^1J_{\text{PH}} = 510,2$ Hz); 7,05 (d, 1H, N– $\text{CH}_2\text{--PO}_2\text{H}$, $^1J_{\text{PH}} = 510,2$ Hz); 7,61 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz); 8,26 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz)

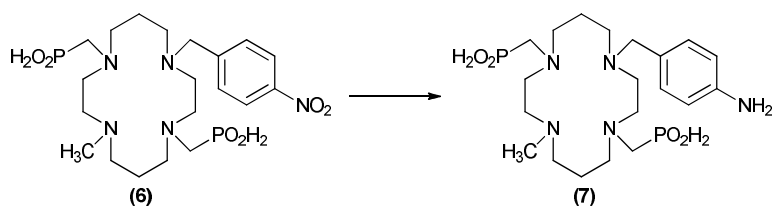
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): $\delta = 18,9, 19,4$ (s, po 1C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 43,3 (s, 1C, N– CH_3); 46,0, 47,6, 48,1, 48,5 (s, po 1C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 49,8, 51,3, 51,5, 52,6 (s, po 1C, N– $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$); 56,5 (d, 1C, N– $\text{CH}_2\text{--PO}_2\text{H}$, $^1J_{\text{CP}} = 103$ Hz); 56,9 (d, 1C, N– $\text{CH}_2\text{--PO}_2\text{H}$;

$^1J_{\text{CP}} = 104 \text{ Hz}$); 58,7 (s, 1C, N-CH₂-arom.); 123,4 (s, 2C, arom.); 130,8 (s, 2C, arom.); 145,9 (s, 1C, arom.); 147,1 (s, 1C, arom.)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (121,4 MHz, D₂O + NaOH): $\delta = 21,2$ (s); 21,7 (s)

2.6.2. Příprava látky (7)^[41]

Byly učiněny pokusy o redukci nitro skupiny podle následujících postupů:



Postup 1: redukce pomocí H₂S

Žlutý olej (6) (100 mg) byl převeden do 50ml kulaté baňky a následně rozpuštěn v 10 ml destilované vody. Z Kippova přístroje byl skleněnou kapilárou zaváděn plynný sulfan po dobu 20 minut. Poté byla baňka s reakční směsí umístěna na olejovou lázeň, která byla vyhřátá

na teplotu 55 °C. Směs byla zahřívána a míchána 3 dny. Průběh reakce byl kontrolován na TLC.

Po třech dnech míchání byla směs odpařena do sucha na RVO a následně purifikována na silikagelovém sloupci (60 ml). Nejprve byl sloupec eluován mobilní fází IPAV v poměru 5:1:1. Většina anorganických sirných sloučenin byla eluována s čelem (žlutý pruh na silikagelu). Poté byla použita mobilní fáze IPAV v poměru 7:3:3. Byly postupně jímány frakce a kontrolovány na TLC. Z NMR a MS spekter bylo zjištěno, že reakce neproběhla. Byla získána výchozí látka (6).

Postup 2: redukce vodíkem za přítomnosti Pd/C, pH = 12

Žlutý olej (6) (150 mg) byl převeden do 50ml hruškovité baňky a následně rozpuštěn v 10 ml destilované vody. Pomocí 5% NaOH bylo upraveno pH vzniklého roztoku na pH 12. Do reakční baňky bylo následně naváženo 30 mg katalyzátoru Pd/C. Baňka byla důkladně sekurována a poté byl na ni nasazen balónek s vodíkem. Bazická hydrogenace probíhala přes noc při laboratorní teplotě.

Druhý den byla reakce kontrolována na TLC a MS. Při této redukci však docházelo k odštěpování nitrobenzylové skupiny z makrocyclického skeletu (6) (zjištěno z TLC a MS).

Postup 3: redukce pomocí SnCl_2/Sn

Hnědá látka (**6**) (120 mg, 0,24 mmol) byla převedena do 50ml kulaté baňky a následně rozpuštěna v 10 ml destilované vody. K roztoku bylo přidáno 15 ml chloridu cínatého ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 126 mg, 2,5 ekv.), který byl rozpuštěn ve směsi $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1. Do reakční baňky byl dán kovový Sn a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs kontrolována na TLC a MS. Reakce neproběhla ani po zahřátí reakční směsi. Byla opět izolována výchozí látka (**6**).

Postup 4: redukce pomocí Na_2S

Žlutý olej (**6**) (0,5 g) byl převeden do 100ml kulaté baňky a následně rozpuštěn v 10 ml destilované vody. K tomuto roztoku byl přidán roztok nonahydrátu sulfidu sodného (4,8 g, 19,7 mmol, 20 ekv.) v 10 ml destilované vody. Ihned po přidání se vytvořil žlutozelený zákal, který se později částečně rozpustil. Reakční směs byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na 50 °C a míchána 3 dny. Průběh reakce byl kontrolován na TLC. Po třech dnech míchání byla směs odpařena do sucha na RVO a následně purifikována na silikagelovém sloupci (60 ml). Nejprve byl sloupec eluován mobilní fází IPAV v poměru 5:1:1. Většina anorganických sirných sloučenin byla eluována s čelem (žlutý pruh na silikagelu). Poté byla použita mobilní fáze IPAV v poměru 7:3:3. Byly postupně jímány frakce a kontrolovány na TLC. Frakce s produktem byly spojeny dohromady, odpařeny na RVO a látka (**7**) byla chromatografována na slabém kationtovém iontoměniči (Amberlit 50, 100–200 mesh, 2x15 cm), který byl předem převeden do H^+ -cyklu. Kolona byla promývána velkým množstvím destilované vody (500 ml). Produkt (**7**) byl následně eluován 3% roztokem kyseliny chlorovodíkové a vzniklý hydrochlorid látky (**7**) byl do sucha odpařen na RVO. Látka (**7**) byla poté nanesena na kolonu se silným kationtovým iontoměničem v H^+ -cyklu (Dowex 50, 50–100 mesh, 2x20 cm). Produkt byl eluován 5% roztokem pyridinu. Byl získán světle žlutý olej (**7**), který byl zbaven zbytkových rozpouštědel lyofilizací. Byla získána pevná látka (**7**), jejíž hmotnost činila 350 mg (74 % na výchozí látku (**6**)).

Charakterizace látky (**7**):

TLC: mobilní fáze: IPAV (7:3:3), R_f = 0,35 (ninhydrin: světle fialová skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle zelená skvrna)

MS (+): 476,3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 476,2)

^1H NMR (299,9 MHz, D_2O): δ = 2,15–1,18 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 3,16 (s, 3H, N--CH_3); 2,99–3,83 (m, 16H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 4,56 (s, 2H, $\text{N--CH}_2\text{--}$

arom.); 6,06 (d, 1H, N-CH₂-PO₂H, ¹J_{PH} = 511,9 Hz); 7,02 (d, 2H, arom., ³J_{HH} = 8,4 Hz); 7,41 (d, 2H, arom., ³J_{HH} = 8,4 Hz); 7,76 (d, 1H, N-CH₂-PO₂H, ¹J_{PH} = 511,9 Hz)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, D₂O): δ = 20,6, 20,9 (s, po 1C, CH₂-CH₂-CH₂); 42,1, 42,4 (s, po 1C, CH₂-CH₂-CH₂); 48,1 (d, 1C, N-CH₂-PO₂H, ¹J_{CP} = 42 Hz); 49,2 (s, 1C, N-CH₃); 53,6 (d, 1C, N-CH₂-PO₂H, ¹J_{CP} = 42 Hz); 53,7, 54,1, (s, po 1C, CH₂-CH₂-CH₂); 54,5, 57,3, 57,5, 57,6 (s, po 1C, N-CH₂-CH₂-N); 57,9 (s, 1C, N-CH₂-arom.); 124,2 (s, 2C, arom.); 129,4 (s, 2C, arom.); 131,3 (s, 1C, arom.); 133,3 (s, 1C, arom.)

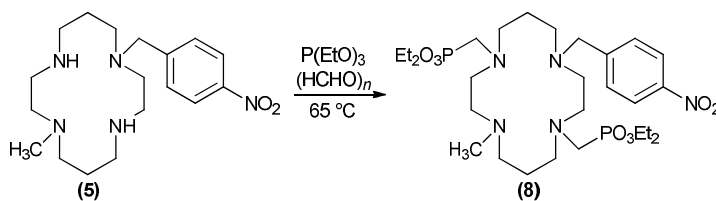
³¹P{¹H} NMR (121,4 MHz, D₂O): δ = 23,5 (s); 23,9 (s)

³¹P NMR (121,4 MHz, D₂O): δ = 23,5 (d, ¹J_{PH} = 552 Hz); 24,0 (d, ¹J_{PH} = 552 Hz)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) C₂₀H₃₉N₅O₄P₂·2,5H₂O: C 46,37 (46,15), H 8,78 (8,52), N 13,38 (13,45), P 11,96 (11,90)

2.7. Navázání fosfonátových pendantních ramen a redukce nitro skupiny

2.7.1. Příprava látky (8)



Látka (5) (1,95 g, 5,6 mmol) byla navážena do 100ml kulaté baňky s míchadlem. Následně byl přilít triethylfosfit (10,0 g, 60,2 mmol, 11 ekv.). Baňka se směsí byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na 65 °C. Po rozpuštění výchozí látky (5) byl přisypán paraformaldehyd (0,8 g, 3,2 ekv.). Na baňku bylo nasazeno septum a reakční směs byla míchána v olejové lázni vyhřáté na teplotu 65 °C po dobu 5 dní.

Po ochlazení byl vzniklý tmavě žlutý roztok nanesen na kolonu se silným kationtovým iontoměničem (Dowex 50, 50–100 mesh, 2x20 cm) v H⁺-cyklu. Kolona byla vyplachována velkým množstvím směsi destilované vody a ethanolu (1,5 l) v poměru 1:1. Produkt (8) byl z kolony eluován směsí ethanolu a amoniaku v poměru 5:1 a byl následně odpařen na RVO (teplota lázně 55 °C). Látka (8) byla získána ve formě zlatavého oleje, jehož hmotnost činila 2,9 g (81 % na výchozí látku (5)).

Charakterizace látky (8):

TLC: mobilní fáze: MeCN:MeOH:NH₃ (10:5:1), $R_f = 0,35$ (ninhydrin: světle hnědá skvrna, CuSO₄·5H₂O: zelená skvrna)

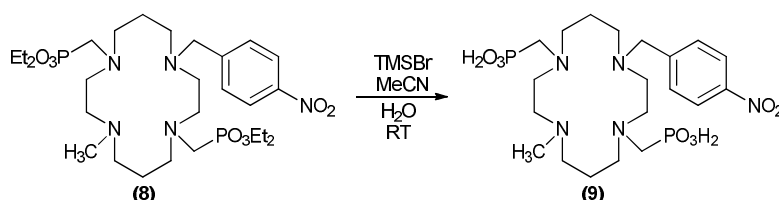
MS (+): 651,0 ([M+H]⁺, teor. 651,3)

¹H NMR (600,2 MHz, DMSO): $\delta = 1,13\text{--}1,25$ (m, 12H, P–O–CH₂–CH₃); 1,53–1,57 (m, 4H, CH₂–CH₂–CH₂); 2,14 (s, 3H, N–CH₃); 2,32–2,68 (m, 16H, CH₂–CH₂–CH₂, N–CH₂–CH₂–N) 2,75–2,84 (m, 4H, N–CH₂–P); 3,63 (s, 2H, N–CH₂–arom.); 3,89–4,02 (m, 8H, P–O–CH₂–CH₃); 7,62 (d, 2H, arom., ³J_{HH} = 8,4 Hz); 8,17 (d, 2H, arom., ³J_{HH} = 8,4 Hz)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, DMSO): $\delta = 16,8$ (d, 4C, P–O–CH₂–CH₃, ³J_{CP} = 6 Hz); 24,0, 24,3 (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 43,1 (s, 1C, N–CH₃); 49,5 (d, 1C, N–CH₂–P, ¹J_{CP} = 59 Hz); 50,6 (d, 1C, N–CH₂–P, ¹J_{CP} = 60 Hz); 51,0, 51,7, 52,1, 52,2 (s, po 1C, CH₂–CH₂–CH₂); 52,4, 52,5, 54,6, 55,1 (s, po 1C, N–CH₂–CH₂–N); 57,8 (s, 1C, N–CH₂–arom.); 61,6 (d, 4C, P–O–CH₂–CH₃, ²J_{CP} = 10 Hz); 123,5 (s, 2C, arom.); 130,2 (s, 2C, arom.); 146,8 (s, 1C, arom.); 149,2 (s, 1C, arom.)

³¹P{¹H} NMR (121,4 MHz, DMSO): $\delta = 21,4$ (s); 22,6 (s)

2.7.2. Příprava látky (9)



Zlatavý olej (8) (2,9 g) byl navážen do 250ml kulaté baňky, která byla z vnější strany obalena alobalem. Produkt (8) byl rozpuštěn ve 100 ml bezvodého acetonitrilu a vzniklý roztok byl intenzivně míchán na magnetické míchačce. Injekční stříkačkou byl přidán trimethylsilylbromid (TMSBr, 13,7 g, 90,0 mmol, 20 ekv.) a baňka byla ihned zavřena skleněnou zátkou. Reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě.

Po uplynutí reakční doby byla skleněná zátka a zábrus baňky důkladně otřen vatou (vzniklý HBr) a meziprodukt v baňce byl odpařen na RVO do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml bezvodého acetonitrilu. Vzniklý roztok byl rychle vylit do předem připravené kádinky se 400 ml destilované vody. Produkt (9) byl přelit do 1 l kulaté baňky a následně odpařen na RVO do sucha. Odparek byl znovu rozpuštěn ve 400 ml destilované vody a následně odpařen na RVO (postup 3x opakován).

Připravená látka byla rozpuštěna v malém množství kyseliny bromovodíkové a produkt **(9)** byl vysrážen ethanolom. Pevný podíl byl odfiltrován na fritě S4 a vysušen na vzduchu. Byla připravena hnědá pevná látka **(9)**, jejíž hmotnost činila 2,8 g.

Charakterizace látky **(9)**:

TLC: mobilní fáze: IPAV (10:3:3), $R_f = 0,15$ (ninhydrin: světle hnědá skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle modrá skvrna)

MS (+): 538,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 538,2); **(-):** 536,7 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, teor. 536,2)

^1H NMR (600,2 MHz, D_2O): $\delta = 1,70\text{--}1,73$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,27 (s, 3H, N- CH_3); 2,53–2,92 (m, 16H, N- $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 3,70 (d, 4H, N- $\text{CH}_2\text{--P}$, $^2J_{\text{PH}} = 9,1$ Hz) 3,81 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{--arom.}$); 7,61 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz); 8,24 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz)

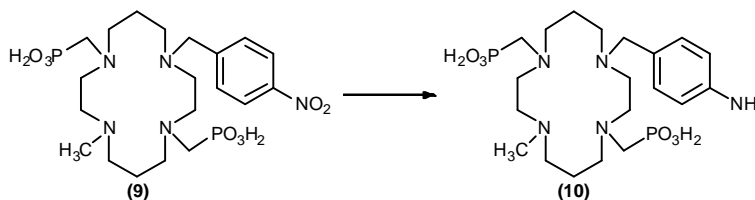
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): $\delta = 18,7, 19,8$ (s, po 1C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 43,1 (s, C, N- CH_3); 46,3, 47,6, 47,7, 47,8 (s, po 1C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 49,2, 50,1, 51,0, 52,6 (s, po 1C, N- $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$); 54,3 (d, 2C, N- $\text{CH}_2\text{--P}$, $^1J_{\text{CP}} = 140$ Hz); 54,7 (d, 2C, N- $\text{CH}_2\text{--P}$, $^1J_{\text{CP}} = 142$ Hz); 58,4 (s, 1C, N- $\text{CH}_2\text{--arom.}$); 123,6 (s, 2C, arom.); 130,7 (s, 2C, arom.); 145,6 (s, 1C, arom.); 146,8 (s, 1C, arom.)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (121,4 MHz, $\text{D}_2\text{O} + \text{NaOH}$): $\delta = 12,9$ (s)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}_2 \cdot 3\text{HBr}$: C 29,71 (30,79), H 5,61 (5,17), N 8,10 (8,98), P 7,58 (7,94), Br 27,49 (30,72)

2.7.3. Příprava látky **(10)**^[41]

Byly učiněny pokusy o redukci nitro skupiny podle následujících postupů:



Postup 1: redukce pomocí Na_2S , pH = 12 a pH = 9

Hnědá látka **(9)** (0,50 g, 0,64 mmol) byla převedena do 250ml kulaté baňky a následně rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku byl přidán roztok nonahydrátu sulfidu sodného (4,8 g, 19,7 mmol, 20 ekv.) v 10 ml destilované vody. Ihned po přidání se vytvořil žlutozelený zákal, který se později rozpustil. Následně bylo upraveno pH vzniklé

reakční směsi HCl:H₂O 1:1 na pH 12. Reakční směs byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na 60 °C a míchána 3 dny. Reakce byla kontrolována na TLC. Po pěti dnech míchání byla směs odpařena do sucha na RVO a následně purifikována na silikagelovém sloupci (90 ml).

Většina anorganických sirných sloučenin byla eluována (IPAV v poměru 5:1:1) s čelem (žlutý pruh na silikagelu) a produkt se prakticky nepohyboval. Poté byla použita mobilní fáze IPAV v poměru 7:3:3. Byly postupně jímány frakce a kontrolovány na TLC. Frakce byly na základě TLC spojeny dohromady, odpařeny na RVO. Vzniklá směs byla chromatografována na slabém kationtovém iontoměniči (Amberlit 50, 100–200 mesh, 2x10 cm), který byl předem převeden do H⁺-cyklu. Kolona byla promývána velkým množstvím destilované vody (500 ml). Produkt (**10**) byl následně eluován 3% roztokem kyseliny chlorovodíkové. Z NMR a MS spekter bylo zjištěno, že redukce nitro skupiny látky (**9**) nebyla kvantitativní (vznik směsi výchozí látky (**9**) a cíleného produktu (**10**) v poměru 40:60).

Reakce byla zkoušena také při pH roztoku 9 stejným postupem. Z NMR a MS spekter bylo zjištěno, že redukce nitro skupiny látky (**9**) opět nebyla kvantitativní (vznik směsi výchozí látky (**9**) a cíleného produktu (**10**) v poměru 20:80).

Postup 2: redukce pomocí Na₂S, pH = 6

Hnědá látka (**9**) (0,50 g, 0,64 mmol) byla převedena do 250ml kulaté baňky a následně rozpuštěna ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku byl přidán roztok nonahydrátu sulfidu sodného (4,8 g, 19,7 mmol, 20 ekv.) v 10 ml destilované vody. Ihned po přidání se vytvořil žlutozelený zákal, který se později rozpustil. Následně bylo upraveno pH vzniklé reakční směsi HCl:H₂O 1:1 na pH 6. Reakční směs byla umístěna do olejové lázně vyhřáté na 60 °C a míchána 3 dny. Reakce byla kontrolována na TLC. Po pěti dnech míchání byla směs odpařena do sucha na RVO a následně purifikována na silikagelovém sloupci (90 ml).

Většina anorganických sirných sloučenin byla eluována (IPAV v poměru 5:1:1) s čelem (žlutý pruh na silikagelu) a produkt se prakticky nepohyboval. Poté byla použita mobilní fáze IPAV v poměru 7:3:3. Byly postupně jímány frakce a kontrolovány na TLC. Frakce s produktem byly spojeny dohromady, odpařeny na RVO a látka (**10**) byla chromatografována na slabém kationtovém iontoměniči. Produkt (**10**) byl nanesen na slabý katex (Amberlit 50, 100–200 mesh, 2x10 cm), který byl předem převeden do H⁺-cyklu. Kolona byla promývána velkým množstvím destilované vody (500 ml). Produkt (**10**) byl následně eluován 3% roztokem kyseliny chlorovodíkové a vzniklý hydrochlorid látky (**10**) byl do sucha odpařen na RVO. Látka (**10**) byla poté nanesena na kolonu se silným kationtovým iontoměničem v H⁺-cyklu (Dowex 50, 50–100 mesh, 2x20 cm). Produkt byl eluován 5% roztokem pyridinu.

Byl získán světle žlutý olej (**10**), jehož hmotnost činila 250 mg (50 % na výchozí látku (**9**)).

Postup 3: redukce pomocí H_2S

Hnědá látka (**6**) (100 mg, 0,13 mmol) byla převedena do 50ml kulaté baňky a následně rozpuštěna v 10 ml destilované vody. Z Kippova přístroje byl skleněnou kapilárou zaváděn plynný sulfan po dobu 20 minut. Poté byla baňka s reakční směsí umístěna na olejovou lázeň, která byla vyhřátá na teplotu 60 °C. Směs byla zahřívána a míchána 3 dny. Průběh reakce byl kontrolován na TLC.

Po třech dnech míchání byla směs odpařena do sucha na RVO a následně purifikována na silikagelovém sloupci (60 ml). Nejprve byl sloupec eluován mobilní fází IPAV v poměru 5:1:1. Většina anorganických sirných sloučenin byla eluována s čelem (žlutý pruh na silikagelu). Poté byla použita mobilní fáze IPAV v poměru 7:3:3. Byly postupně jímány frakce a kontrolovány na TLC. Bylo zjištěno z NMR a MS spekter, že reakce neproběhla. Byla získána výchozí látka (**9**).

Postup 4: redukce pomocí SnCl_2/Sn

Hnědá látka (**9**) (120 mg, 0,15 mmol) byla převedena do 50ml kulaté baňky a následně rozpuštěna v 10 ml destilované vody. K roztoku bylo přidáno 15 ml chloridu cínatého ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 126 mg, 2,5 ekv.), který byl rozpuštěn ve směsi $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1. Do reakční baňky byl dán kovový Sn a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla reakční směs kontrolována na TLC a MS. Reakce neproběhla ani po zahřátí reakční směsi a byla získána opět výchozí látka (**9**).

Postup 5: redukce vodíkem za přítomnosti Pd/C, pH = 12

Hnědá látka (**9**) (120 mg, 0,15 mmol) byla převedena do 50ml hruškovité baňky a následně rozpuštěna v 10 ml destilované vody. Pomocí 5% NaOH bylo upraveno pH vzniklého roztoku na pH 12. Do reakční baňky bylo následně naváženo 30 mg katalyzátoru Pd/C. Baňka byla důkladně sekurována a poté byl na ni nasazen balónek s vodíkem. Bazická hydrogenace probíhala přes noc při laboratorní teplotě.

Druhý den byla reakce kontrolována na TLC a MS. Při této redukci však docházelo k odštěpování nitrobenzylové skupiny z makrocyclického skeletu (**9**) (zjištěno z TLC a MS).

Postup 6: redukce nascentním vodíkem v kyselém prostředí

Hnědá látka (**9**) (300 mg, 0,38 mmol) byla převedena do 50ml kulaté baňky a následně rozpuštěna v 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Následně byly k roztoku přidány železné piliny (Fe, 220 mg, 3,90 mmol, 10 ekv.), baňka byla opatřena míchadlem a gumovým septem. Vzniklá reakční směs byla míchána 3 dny při laboratorní teplotě.

Poté byla reakční směs přefiltrována přes fritu S4 a filtrát byl na RVO odpařen do sucha. K odparku byl přilít 5% roztok amoniaku a baňka byla ponechána přes noc otevřená v digestoři. Vysrážený hydroxid železitý byl následující den přefiltrován přes skládaný filtrační papír a přes fritu S4, koloidní železo bylo odstraněno centrifugací. Roztok byl poté nanesen na silný kationtový iontoměnič v H⁺-cyklu (Dowex 50, 50–100 mesh, 2x60 cm). Kolona byla promývána velkým množstvím destilované vody (500 ml). Produkt (**10**) byl následně eluován z kolony 5% roztokem amoniaku.

Redukce nitro skupiny částečně probíhala, avšak ani po optimalizaci reakčních podmínek reakce nedoběhla k požadovanému produktu. Bylo pozorováno částečné odpařování *p*-nitrobenzylu (směs výchozí látky (**9**) a produktu (**10**) v poměru 40:60).

Postup 7: redukce vodíkem za přítomnosti NaBH₄/Ni, pH = 10

Hnědá látka (**9**) (2 g, 2,6 mmol) byla rozpuštěna v 20 ml destilované vody, 20 ml ethanolu a k vzniklému roztoku byl přilít 5% roztok NaOH (pH upraveno na hodnotu 12). Do trojhrdlé 100ml baňky byl navážen hexahydrát chloridu nikelnatého (66 mg, 0,28 mmol, 0,1 ekv.) a následně pod proudem argonu rozpuštěn v 10 ml destilované vody. K vzniklému roztoku nikelnaté sole byl poté přisypán tetrahydridoboritan sodný (NaBH₄, 88 mg, 0,9 mmol, 1 ekv.) a ihned byl přidán bazický roztok látky (**9**). Po 5 minutách míchání byla přisypána další část tetrahydridoboritanu sodného (NaBH₄, 88 mg, 0,9 mmol, 1 ekv.). Během následujících dvou hodin bylo postupně přidáno dalších 5 ekv. NaBH₄ a vzniklá reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě a pod proudem argonu 24 h.

Poté byla reakční směs filtrována přes fritu S4 (frita obsahovala filtrační papír a malé množství silikagelu) a vyplachována směsí destilované vody a ethanolu v poměru 1:1. Vzniklý filtrát byl odpařen na RVO do sucha. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a vzniklý roztok byl nanesen na silný kationtový iontoměnič v H⁺-cyklu ((Dowex 50, 50–100 mesh, 2x20 cm). Kolona byla vyplachována větším množstvím destilované vody (500 ml). Produkt (**10**) byl následně z kolony eluován 5 % roztokem pyridinu. Látka (**10**) byla získána v podobě žlutého oleje, který byl zbaven zbytkových rozpouštědel lyofilizací. Byla získána pevná látka (**10**), jejíž hmotnost činila 900 mg (79 %

na výchozí látku (9)).

Charakterizace látky (10):

TLC: mobilní fáze: IPA V (7:3:3), $R_f = 0,30$ (ninhydrin: světle oranžová skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle zelená skvrna)

MS (-): 506,7 ($[\text{M}-\text{H}]^+$, teor. 506,2)

^1H NMR (399,9 MHz, D_2O): $\delta = 1,88\text{--}2,81$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,84 (s, 3H, N--CH_3); 2,92–3,43 (m, 16H, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 3,58 (s, 2H, $\text{N--CH}_2\text{--arom.}$); 4,23 (s, 2H, $\text{N--CH}_2\text{--PO}_3\text{H}_2$); 4,32 (s, 2H, $\text{N--CH}_2\text{--PO}_3\text{H}_2$); 6,72 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz); 7,35 (d, 2H, arom., $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): $\delta = 22,2, 22,3$ (s, po 1C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 41,1, (s, 1C, N--CH_3); 47,0, 47,1, 47,3, 49,5 (s, po 1C, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 49,8, (d, 1C, $\text{N--CH}_2\text{--PO}_3\text{H}_2$, $^1J_{\text{CP}} = 88$ Hz); 50,8 (d, 1C, $\text{N--CH}_2\text{--PO}_3\text{H}_2$, $^1J_{\text{CP}} = 97$ Hz); 50,3, 54,0, 54,8, 55,3 (s, po 1C, $\text{N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}$); 56,2 (s, 1C, $\text{N--CH}_2\text{--arom.}$); 116,8 (s, 2C, arom.); 118,7 (s, 2C, arom.); 133,1 (s, 1C, arom.); 146,8 (s, 1C, arom.)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (121,4 MHz, D_2O): $\delta = 20,4$ (s); 20,7 (s)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C 42,74 (42,78), H 8,09 (8,08), N 12,51 (12,47), P 11,42 (11,03)

2.8. Termodynamické vlastnosti komplexů

2.8.1. Potenciometrické titrace ligandu (7)

Titrace volného ligandu (7) a ligandu (7) s ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ni^{2+} byla prováděna z kyselého prostředí (upraveno 0,028M HNO_3) do bazického prostředí (titrováno 0,214M KOH). Potenciometrické titrace byly prováděny při teplotě 25 °C a iontové síle 0,1M KNO_3 . Koncentrace ligandu (7) a všech kovů byla 4 mM.

Díky relativně pomalým kinetikám vzniku komplexů byly titrace měďnatého, zinečnatého a nikelnatého komplexu prováděny tzv. baničkovou metodou. Jednotlivé body byly namíchány do zkumavek a $-\log[\text{H}^+]$ roztoků o daném složení bylo změřeno (Cu^{2+} – 4 dny po namíchání, Zn^{2+} – 6 dní po namíchání, Ni^{2+} – 40 dní po namíchání).

2.8.2. Potenciometrické titrace ligandu (10)

Titrace volného ligandu (10) a ligandu (10) s ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ni^{2+} byla prováděna z kyselého prostředí (upraveno 0,031M HNO_3) do bazického prostředí (titrováno 0,214M KOH). Potenciometrické titrace byly prováděny při teplotě 25 °C a iontové síle 0,1M KNO_3 . Koncentrace ligandu (10) a všech kovů byla 4 mM.

Díky relativně pomalým kinetikám vzniku komplexů byly titrace měďnatého a nikelnatého komplexu prováděny tzv. baničkovou metodou. Jednotlivé body byly namíchány do zkumavek a $-\log[\text{H}^+]$ roztoků o daném složení bylo změřeno (Cu^{2+} – 4 dny po namíchání, Ni^{2+} – 50 dní po namíchání). V případě zinečnatého komplexu byla titrace provedena konvenční metodou, s čekacími časy před odečtem potenciálu cca 4 min.

2.9. Formační a disociační kinetiky

Byly připraveny zásobní roztoky pro měření formačních kinetik:

Byly připraveny zásobní roztoky chloracetátového, fosfátového a acetátového pufru. Ve 100ml odměrné baňce byl připraven 0,033M roztok kyseliny chloroctové (0,315 g) (kyselina byla vyčištěna dvojnásobnou rekrystalizací za horka z nasyceného vodného roztoku). Roztok kyseliny fosforečné byl připraven naředěním 95 mg 85% kyseliny octové ve 25 ml odměrné baňce (0,033 M). Kyselina octová o koncentraci 0,033 M byla připravena naředěním 50 mg 99% kyseliny octové ve 25ml odměrné baňce.

Dále bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku chloridu draselného o koncentraci 0,20 M (1,491 g). Roztok draselné sole je určen k udržení konstantní iontové síly.

K úpravě pH výše uvedených pufrů byl připraven 5% roztok hydroxidu draselného tak, že bylo rozpuštěno 5 g KOH ve 100 ml destilované vody.

V 10ml odměrné baňce byl připraven 50 mM roztok chloridu měďnatého (85,2 mg).

Byly připraveny zásobní roztoky pro měření disociačních kinetik:

Odměrný roztok hydroxidu sodného (0,103 M) byl faktorován titrací pomocí dihydrátu kyseliny šťavelové. Tímto roztokem byla titrována kyselina chloristá, stanovená koncentrace činila 5,43 M.

K udržení konstantní iontové síly (5,0 M) roztoků byl zvolen roztok chloristanu sodného. Ve 250ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 193,13 g chloristanu sodného (výsledná $c = 5,5$ M).

V Tab. 5 jsou uvedeny složení roztoků pro měření disociačních kinetik komplexu Cu-(7) a Cu-(10).

Tab. 5: Složení roztoků pro měření disociačních kinetik Cu-(7) a Cu-(10)^[42]

$c(\text{HClO}_4)$ [M]	$V(\text{HClO}_4)$ [μl]	$V(\text{NaClO}_4)$ [μl]	$V[\text{Cu}-(7)/(10)]$ [μl]
4,89	900	0	100
3,99	735	165	100
3,01	555	345	100
2,01	370	530	100
1,00	185	715	100
0,75	140	760	100
0,50	92	808	100
0,25	46	854	100
0,10	18	882	100
0,05 ⁱ	92	808	100
0,025 ⁱ	46	854	100

ⁱkyselina o této koncentraci byla připravena z 10x zředěného zásobního roztoku kyseliny chloristé $c = 0,543\text{M}$ (naředěno 5,5M NaClO_4)

2.9.1. Formační a disociační kinetiky Cu-(7)^[42]

Formační kinetiky:

Roztok ligandu (7) o koncentraci 1,15 mM byl připraven rozpuštěním 4,75 mg ligandu (7) v destilované vodě a následným naředěním na objem 10 ml v odměrné baňce.

Rychlost vzniku měďnatého komplexu ligandu (7) byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 310 nm, teplotě 25,0 °C, koncentraci ligandu (7) 115,7 μM a s iontovou silou 0,1 M (KCl) při různých hodnotách pH.

Do 1cm křemenné kyvety byly postupně pipetovány požadované objemy jednotlivých zásobních roztoků. Reakční směs se skládala vždy ze 100 μl ligandu, 500 μl roztoku KCl a 300 μl pufru. Hodnota pH pufrů byla zjištěna pomocí pH elektrody a upravena 5% roztokem KOH. Následně byla kyveta s reakční směsí temperována v karuselu spektrofotometru. Poté bylo přidáno 100 μl zásobního roztoku CuCl_2 a kyveta byla promíchána otočením a ihned

bylo spuštěno kinetické měření. Doba měření byla volena podle složení reakční směsi v rozmezí několika sekund až minut. Hodnota pH použitá pro výpočty byla získána jako aritmetický průměr výchozí hodnoty pH (výchozí pH všech komponent v kyvetě vyjma měďnatých iontů) a konečné hodnoty pH (pH po ukončení kinetického měření).

Disociační kinetiky:

Měďnatý komplex Cu-(**7**) pro kinetická měření byl připraven následujícím postupem. Do malé lékovky bylo naváženo 40,0 mg ligandu (**7**). Ligand (**7**) byl následně rozpuštěn ve 4 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 14,4 mg (1 ekv.) dihydrátu chloridu měďnatého. Následně bylo upraveno pH vzniklého roztoku 5% roztokem NaOH na hodnotu pH 6. Vzniklá reakční směs byla ponechána míchána při laboratorní teplotě přes noc. Poté byl vzniklý roztok kvantitativně převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Byl připraven komplex o koncentraci 7,4 mM.

Do 1cm křemenné kyvety byla napipetována kyselina chloristá a roztok chloristanu sodného. Vzniklá reakční směs byla následně v karuselu spektrofotometru vytemperována na teplotu 25 °C (měření bylo provedeno i při teplotách 35 °C, 45 °C a 55 °C). Poté byla kyveta vyjmuta z prostoru spektrofotometru, rychle bylo přidáno 100 µl roztoku komplexu Cu-(**7**). Vzniklý roztok byl promíchán otočením kyvety. Kyveta bylo co nejrychleji vrácena do karuselu spektrofotometru a kinetické měření bylo spuštěno. Složení reakčních směsí uvádí Tab. 5. Byla měřena závislost absorpance při 310 nm na čase. Doba experimentu byla měněna v závislosti na rychlosti disociace komplexu v rozmezí sekund až minut.

2.9.2. Formační a disociační kinetiky Cu-(10**)**

Formační kinetiky:

Roztok ligandu (**10**) o koncentraci 1,00 mM byl připraven rozpuštěním 5,1 mg ligandu (**10**) v destilované vodě a následným naředěním na objem 10 ml v odměrné baňce.

Rychlost vzniku měďnatého komplexu ligandu (**10**) byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 310 nm, teplotě 25,0 °C, koncentraci ligandu (**10**) 100 µM a s iontovou silou 0,1 M (KCl) při různých hodnotách pH.

Do 1cm křemenné kyvety byly postupně pipetovány požadované objemy jednotlivých zásobních roztoků. Reakční směs se skládala vždy ze 100 µl ligandu, 500 µl roztoku KCl a 300 µl pufru. Hodnota pH pufrů byla zjištěna pomocí pH elektrody a upravena 5% roztokem KOH. Následně byla kyveta s reakční směsí temperována v karuselu spektrofotometru. Poté bylo přidáno 100 µl zásobního roztoku CuCl₂ a kyveta byla promíchána otočením a ihned

bylo spuštěno kinetické měření. Doba měření byla volena podle složení reakční směsi v rozmezí několika sekund až minut. Po ukončení kinetického experimentu byla zjištěna konečná hodnota pH roztoku. Hodnota pH použitá pro výpočty byla získána jako aritmetický průměr výchozí hodnoty pH (výchozí pH všech komponent v kyvetě vyjma měďnatých iontů) a konečné hodnoty pH (pH po ukončení kinetického měření).

Disociační kinetiky:

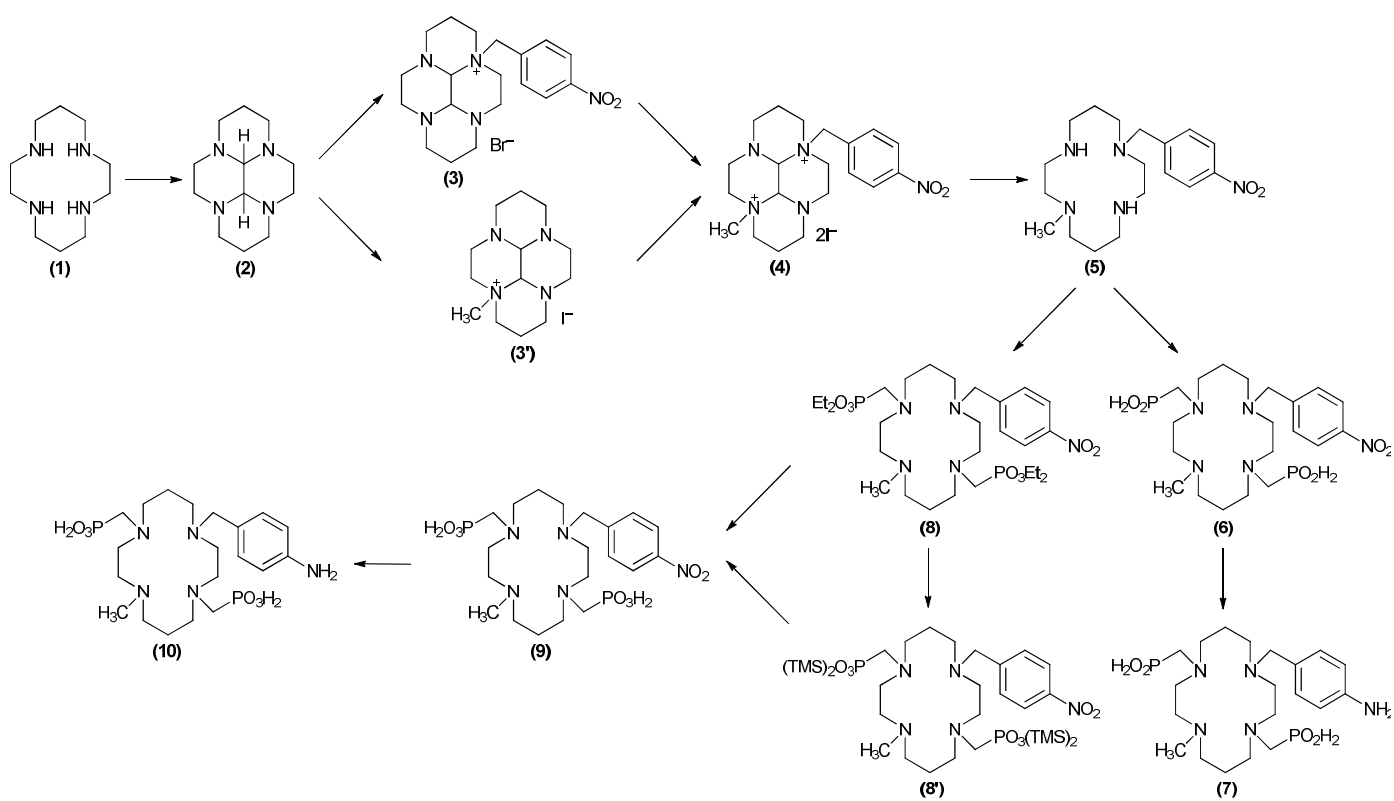
Měďnatý komplex Cu-(**10**) pro kinetická měření byl připraven následujícím postupem. Do malé lékovky bylo naváženo 30,0 mg ligandu (**10**). Ligand (**10**) byl následně rozpuštěn ve 4 ml destilované vody. K tomuto roztoku byl přidán 10,1 mg (1 ekv.) dihydrátu chloridu měďnatého. Následně bylo upraveno pH vzniklého roztoku 5 % roztokem NaOH na hodnotu pH 6. Vzniklá reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Poté byl vzniklý roztok kvantitativně převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Byl připraven komplex o koncentraci 5,9 mM.

Do 1cm křemenné kyvety byla napipetována kyselina chloristá a roztok chloristanu sodného. Vzniklá reakční směs byla následně v karuselu spektrofotometru vytemperována na teplotu 25 °C (měření bylo provedeno i při teplotách 35 °C, 45 °C a 55 °C). Poté byla kyveta vyjmuta z prostoru spektrofotometru, rychle bylo přidáno 100 µl roztoku komplexu Cu-(**10**). Vzniklý roztok byl promíchán otočením kyvety. Kyveta byla co nejrychleji vrácena do karuselu spektrofotometru a kinetické měření bylo spuštěno. Složení reakčních směsí uvádí Tab. 5. Byla měřena závislost absorpance při 310 nm na čase. Doba experimentu byla měněna v závislosti na rychlosti disociace komplexu v rozmezí sekund až minut.

3. Výsledky a diskuze

Sloučeniny, které byly v rámci této diplomové práce připraveny, jsou uvedeny ve schématu 3.

Schéma 3: Schéma syntézy ligandů



3.1. Syntéza výchozích látek

Cyklam (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan) (**1**) byl připraven podle optimalizovaného postupu (postup přípravy výchozí látky je uveden v bakalářské práci^[38]).

Výchozí látka (**1**) vzniká ve čtyřkrokové templátové syntéze bez izolace meziproduktů. V prvním kroku syntézy se nejprve připraví komplex niklu reakcí bis(3-aminopropyl)-1,2-ethylendiaminu (3,2,3-tetraaminu) s chloridem nikelnatým. K takto vytvořenému komplexu je za chlazení přidán horký roztok glyoxalu. Vzniklé dvojné vazby cyklického komplexu niklu jsou následně redukovány vodíkem za přítomnosti Raneyova niklu v bazickém prostředí. Volný cyklam (**1**) se získá reakcí vzniklého nikelnatého komplexu s kyanidem draselným.

Cis-bis(aminal) cyklamu s glyoxalovým můstkem (**2**) vzniká jednokrokovou syntézou z cyklamu (**1**). Je velmi dobře rozpustný ve vodě, proto je nezbytně nutné, aby byla voda (z roztoku přidaného glyoxalu) důkladně odpařena na RVO. K důkladnému odpaření destilované vody (z roztoku monomerního glyoxalu) se využívá azeotropní směsi voda/toluen. Produkt se dá připravit i alternativní syntetickou cestou^[40], kdy dochází k reakci monomerního glyoxalu s roztokem (cyklamu v methanolu) při 3 °C v ledové lázni.

3.2. Syntéza a hydrolýza kvarterních solí

Byly připraveny a charakterizovány obě monokvarterní sole (látky (**3**) a (**3'**)). Pro přípravu těchto látek se osvědčilo použití dobře vysušených rozpouštědel (acetonitril, toluen). Předchozí pokusy za použití rozpouštědel s obsahem vody snižovaly výtěžky reakcí.

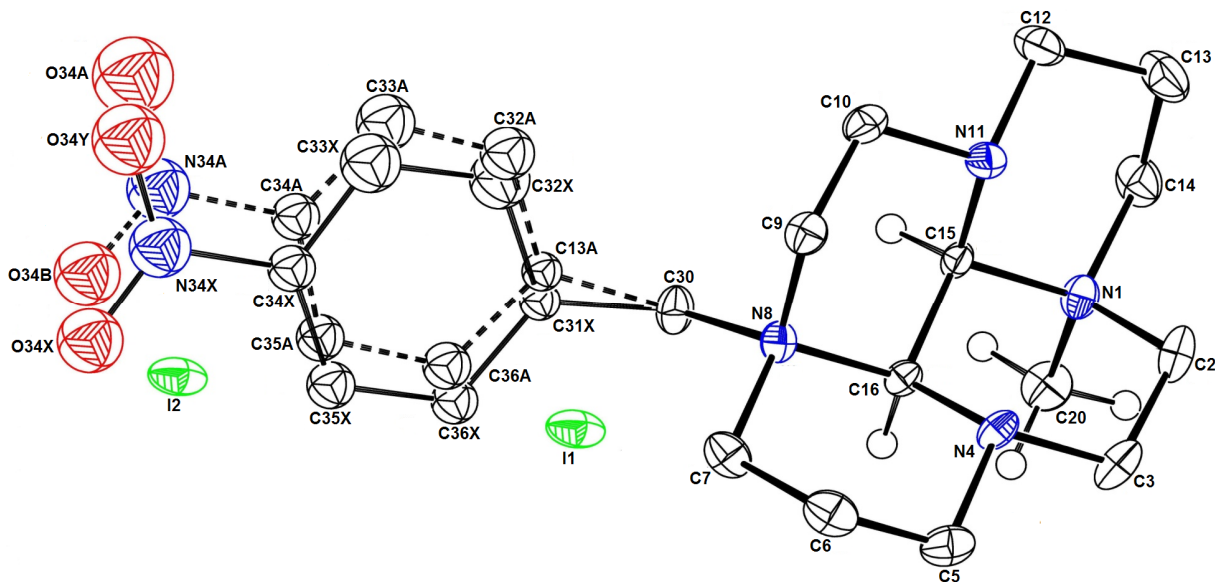
Monokvarterní sůl (**3'**) byla připravena dvěma různými postupy. Reakce byla nejprve zkoušena v bezvodém acetonitrilu, poté v bezvodém toluenu. Z hlediska výtěžku je výhodnější použít toluen (88 % výtěžek na výchozí aminal (**2**), v MeCN je sloučenina (**3'**) lépe rozpustná).

Monokvarterní sůl (**3**) byla připravena podle optimalizovaného postupu^[40]. Pro reakci je vhodné přidat mírný nadbytek *p*-nitrobenzylbromidu. Po reakci je důležité důkladně odstranit přebytečné alkylační činidlo promytím acetonitrem při filtraci produktu (**3**).

Byla snaha připravit biskvarterní sůl (**4**) dvěma odlišnými postupy. Nejprve byla pro syntézu použita sloučenina (**3'**). Reakce byla zkoušena v bezvodém acetonitrilu i v bezvodém dimethylformamidu. Obě reakční směsi byly ponechány míchat týden při laboratorní teplotě. Látka (**4**) nebyla touto syntetickou cestou připravena, neboť alkylace do druhého stupně *p*-nitrobenzylbromidem neproběhla.

Biskvarterní sůl (**4**) byla připravena reakcí výchozí monokvarterní sole (**3**) v acetonitrilu. Alkylace do druhého stupně methyljodidem probíhá kvantitativně (nutné ponechat reakci

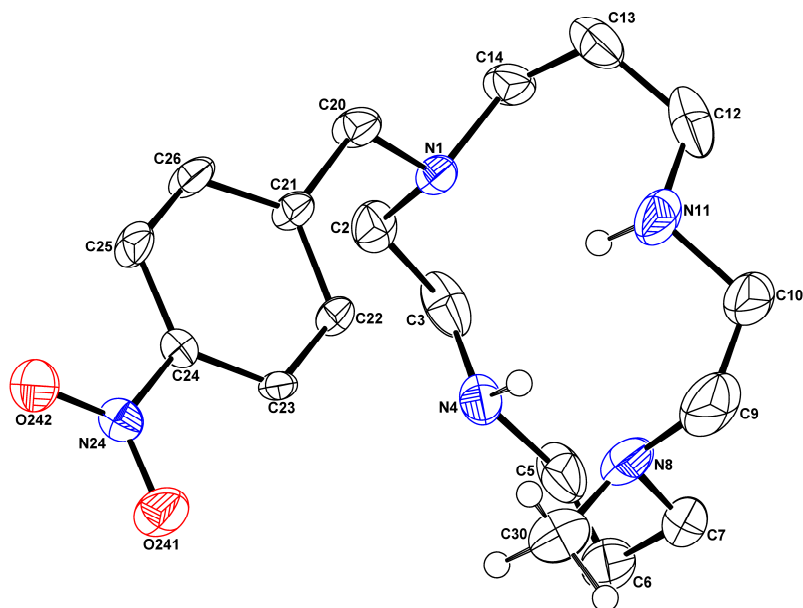
míchat 14 dní). Surová biskvarterní sůl (**4**) byla rekrystalizována z horké destilované vody difúzí EtOH přes plynnou fázi. Při rekrystalizaci byly získány i krystaly vhodné kvality pro měření krystalové struktury pomocí RTG difrakce. Struktura látky (**4**) je uvedena na Obr. 4.



Obr. 4: Rentgenová struktura látky (**4**). Teplotní elipsoidy jsou nakresleny s 50% pravděpodobností. Většina vodíkových atomů není pro zachování přehlednosti zobrazena. 4-nitrobenzyl je vypřesněn disorderovaný ve dvou polohách, jednotlivé pozice jsou obsazeny v poměru 60:40.

Hydrolýza biskvarterní sole (**4**) byla zkoušena dvěma různými postupy. V prvním případě byla snaha odbourat můstek pomocí 20 % roztoku NaOH a vzniklou volnou bází (**5**) následně extrahovat do chloroformu. Z důvodu přítomnosti vedlejšího produktu (majoritní část získaného vzorku, nečistota $R_f = 0,83$, ninhydrin: tmavě žlutá skvrna, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: světle žlutá skvrna), ztrátám při vytřepávání reakční směsi do organického rozpouštědla, následné sloupcové chromatografii a nízkým výtěžkům byl tento postup přípravy shledán nevhodný. Byly také zkoušeny různé molární koncentrace použitého NaOH (0,1M, 0,5M, 1M) avšak bez zlepšení výše uvedených komplikací.

Nejllepší způsob přípravy z hlediska výtěžku reakce byla syntéza v bezvodém prostředí s LiOH v methanolu. Následně byla volná báze extrahována do dichlormethanu. Surový produkt (**5**) byl vykrystalizován difúzí hexanu přes plynnou fázi. Při rekrystalizaci byly získány i krystaly vhodné kvality pro měření krystalové struktury pomocí RTG difrakce. Byla získána rentgenová struktura, viz Obr. 5.



Obr. 5: Rentgenová struktura látky (5). Teplotní elipsoidy jsou nakresleny s 50% pravděpodobností. Většina vodíkových atomů není pro zachování přehlednosti zobrazena.

3.3. Navázání fosfinátových pendantních ramen a příprava ligandu (7)

Při přípravě látky (6) byla použita typická Mannichova reakce ve vodném prostředí (kyselina fosforná, paraformaldehyd). Je nutné, aby reakce probíhala pouze při mírně zvýšené teplotě (asi 40 °C). Při vyšších teplotách dochází k oxidaci kyseliny fosforové a ke vzniku hydroxymethyl derivátu požadovaného produktu. Také je nutné dodržet nízkou teplotu (50 °C) lázně rotační vakuové odparky (RVO); bylo zjištěno, že při vyšších teplotách dochází k částečné oxidaci pendantních ramen.

Redukce nitro skupiny látky (6) byla zkoušena při různých reakčních podmínkách^[43]. Nejprve byla zkoušena redukce nitroskupiny probubláváním bazického roztoku ligandu (6) plyným sulfanem, který byl generován z Kippova přístroje. Reakce neproběhla ani po následném zahřátí reakční směsi (olejová lázeň vyhřátá na 50 °C). Reakční směs byla purifikována na silikagelovém sloupci. Byla získána nezreagovaná výchozí látka (6).

Dále byla zkoušena redukce chloridem cínatým v kyselém prostředí^[44]. Pro zlepšení redukčních vlastností byl do reakce přidán kovový cín. Reakce neproběhla ani po zahřátí reakční směsi. Byla opět izolována výchozí látka (6).

Byla také vyzkoušena hydrogenace na Pd/C v bazickém prostředí. Při této redukci však docházelo k odštěpování nitrobenzylové skupiny z makrocyclického skeletu látky (6) (zjištěno z TLC a MS).

V poslední řadě byla vyzkoušena redukce pomocí Na₂S·9H₂O. Pro hladký průběh reakce

je nezbytně nutné, aby reakční směs byla zahřívána (teplota olejové lázně 50 °C). Nevýhodou této redukce z časového hlediska je množství purifikačních kroků (purifikace na sloupcové chromatografii, na slabém a silném kationtovém iontoměniči).

Průběh všech výše popsaných reakcí lze snadno sledovat pomocí TLC a MS.

3.4. Navázání fosfonátových pendentních ramen a příprava ligandu (10)

Pro přípravu látky (8) byla použita typická Mannichova reakce v bezvodém prostředí (triethylfosfit, paraformaldehyd). Reakce probíhá při teplotě 65 °C. Hydrolyza ethylesterů derivátu (8) na volnou kyselinu byla nejprve zkoušena za varu v prostředí vodné HCl (HCl:H₂O, 1:1), za těchto podmínek však docházelo k odštěpování pendentních fosfonátových ramen.

Látka (9) byla připravena alternativní syntetickou cestou pomocí trimethylsilyl bromidu a následnou hydrolyzou ve vodě. Pro hladký průběh *trans* esterifikačního stupně reakce je nezbytně nutné udržovat striktně bezvodé prostředí.

Redukce nitro skupiny látky (9) byla zkoušena při různých reakčních podmínkách^[43].

Nejprve byla vyzkoušena redukce nitroskupiny probubláváním reakční směsi plynným sulfanem z Kippova přístroje. Reakce neproběhla ani po následném zahřátí reakční směsi (olejová lázeň vyhřátá na 60 °C). Byla opět izolována výchozí látka.

Dále byla zkoušena redukce chloridem cínatým v kyselém prostředí^[44]. Pro zlepšení redukčních vlastností byl do reakce přidán kovový cín. Reakce neproběhla ani po zahřátí reakční směsi. Byla opět izolována výchozí látka (9).

Byla vyzkoušena také hydrogenace na Pd/C v bazickém prostředí. Při této redukci však docházelo k odštěpování nitrobenzylové skupiny z makrocyclického skeletu látky (9) (dále z MS a TLC bylo vidět velké množství vedlejších produktů).

Byla také zkoušena redukce nasacetním vodíkem, který byl generován z kyselého prostředí (směs železných pilin a kyseliny chlorovodíkové). Redukce nitro skupiny částečně probíhala, avšak ani po optimalizaci reakčních podmínek reakce nedoběhla k požadovanému produktu (bylo pozorováno částečné odštěpování *p*-nitrobenzylu a byla izolována směs výchozí látky (9) a produktu (10) v poměru 40:60).

Dále byla vyzkoušena redukce pomocí nadbytku Na₂S·9H₂O. Pro hladký průběh reakce je nezbytně nutné upravit pH reakční směsi na pH 6 a také reakční směs zahřát (teplota olejové lázně 60 °C). Nevýhodou této redukce z časového hlediska je množství purifikačních kroků (purifikace na sloupcové chromatografii a slabém a silném kationtovém iontoměniči).

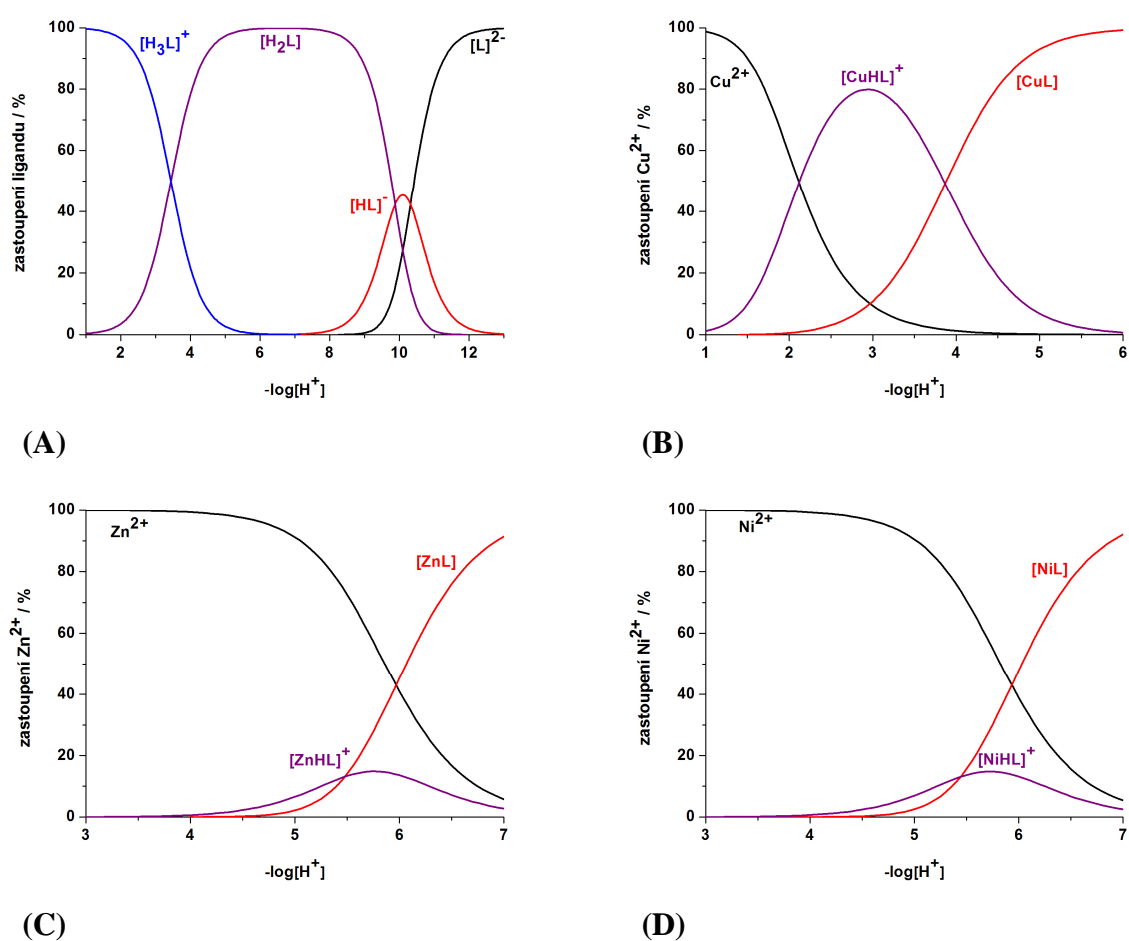
Dále byla snaha zredukovat nitro skupinu látky (9) pomocí katalytické redukce

tetrahydridoboritanem sodným za přítomnosti kovového niklu. Redukce probíhala v inertní atmosféře argonu při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Po reakci se v reakční směsi nachází kovový nikl a kyselina boritá, proto musí být produkt **(10)** následně filtrován přes malé množství silikagelu a purifikován na silném kationtovém iontoměniči v H^+ -cyklu. Tato redukce se ukázala jako nejvhodnější metoda přípravy látky **(10)**.

Průběh všech výše popsaných reakcí lze snadno sledovat pomocí TLC a MS.

3.5. Potenciometrické titrace látky (7)

Z potenciometrických titrací byly získány protonizační konstanty volného ligandu (7), a konstanty stability a protonizační konstanty měďnatého, zinečnatého a nikelnatého komplexu. Termodynamické parametry byly získány programem Opium^[45]. Na Obr. 6(A) je uveden distribuční diagram studovaného ligandu (7). Distribuční diagramy ekvimolárních směsí ligandu (7) a iontů měďnatých, zinečnatých a nikelnatých v závislosti na pH jsou uvedeny na Obr. 6(B), (C) a (D). Protonizační konstanty ligandu (7) jsou uvedeny v Tab. 6. Konstanty stability a protonizační konstanty komplexů Cu-(7), Zn-(7) a Ni-(7) jsou uvedeny v Tab. 7.



Obr. 6: Distribuční diagramy volného ligandu (7), $c_L = 4$ mM (A) a systémů M-(7) (M = Cu^{2+} (B), Zn^{2+} (C) a Ni^{2+} (D)), ligand:kov v poměru 1:1, $c_L = c_M = 4$ mM, konstantní iontová síla 0,1M KNO_3 , 25 °C).

V silně kyselé oblasti ($pH \sim 1$) se vyskytuje (100 %) protonizovaná částice $[H_3L]^+$. Při hodnotě $pH \sim 1,5$ se začíná tvořit částice $[H_2L]$, maximálního zastoupení nabývá v slabě kyselé oblasti $pH \sim 6$. Jednou protonizovaná částice $[HL]^-$ se objevuje při $pH \sim 8$,

maximálního zastoupení (45 %) dosáhne při pH ~ 10. Zcela deprotonizovaný ligand $[L]^{2-}$ vzniká nad pH ~ 9.

Tab. 6: Protonizační konstanty ligandu (7) a odpovídající pK_A

h	$\log \beta_h$	pK_{Ah}
1	$10,30 \pm 0,01$	10,31
2	$20,19 \pm 0,01$	9,88
3	$23,63 \pm 0,01$	3,44

V systému Cu^{2+} :ligand (v poměru 1:1) začíná komplexace při pH ~ 1, vzniká protonizovaný komplex $[CuHL]^+$ (maximálního zastoupení 80 % nabývá při pH ~ 3). Při pH ~ 2 se začíná tvořit částice $[CuL]$. Nad pH ~ 5 je prakticky jedinou částicí v roztoku (zastoupení 100 %) a při tomto pH je ion Cu^{2+} je zcela komplexován.

V systému Zn^{2+} :ligand (v poměru 1:1) začíná komplexace při pH ~ 4, vzniká protonizovaný komplex $[ZnHL]^+$ (maximální zastoupení 20 %). Částice $[ZnL]$ je v systému objevuje při pH ~ 5 a v neutrální oblasti je jedinou částicí v roztoku (90 %).

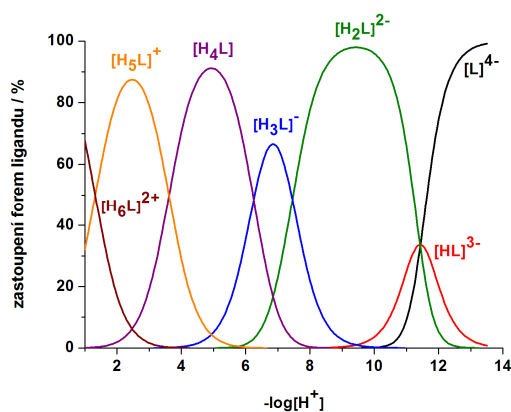
Komplexace Ni^{2+} začíná při pH ~ 4 tvorbou komplexu $[NiHL]^+$, který nabývá maximálního zastoupení 20 %. Dále ve slabě kyselém prostředí pH ~ 5 se tvoří částice $[NiL]$, maximální zastoupení 90 %.

Tab. 7: Konstanty stability a protonizační konstanty komplexů Cu-(7), Zn-(7) a Ni-(7)

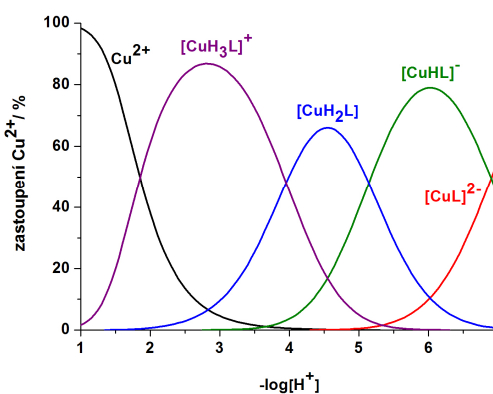
kation	h	l	m	$\log \beta_{hlm}$	pK_{Ah}
Cu(II)	0	1	1	$18,25 \pm 0,05$	
	1	1	1	$22,12 \pm 0,02$	3,87
Zn(II)	0	1	1	$11,02 \pm 0,02$	
	1	1	1	$16,50 \pm 0,09$	5,48
Ni(II)	0	1	1	$11,09 \pm 0,04$	
	1	1	1	$16,53 \pm 0,23$	5,47

3.6. Potenciometrické titrace látky (10)

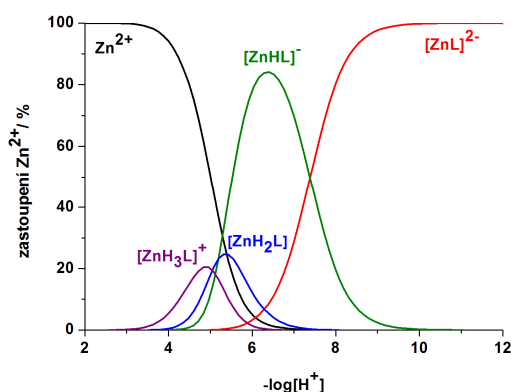
Z potenciometrických titrací byly získány protonizační konstanty volného ligandu (10), a konstanty stability a protonizační konstanty měďnatého, zinečnatého a nikelnatého komplexu. Termodynamické parametry byly získány programem Opium^[45]. Na Obr. 7(A) je uveden distribuční diagram studovaného ligandu (10). Distribuční diagramy ekvimolárních směsí ligandu (10) a iontů měďnatých, zinečnatých a nikelnatých v závislosti na pH jsou uvedeny na Obr. 7(B), (C) a (D). Protonizační konstanty ligandu (10) jsou uvedeny v Tab. 8. Konstanty stability a protonizační konstanty komplexů Cu-(10), Zn-(10) a Ni-(10) jsou uvedeny v Tab. 9.



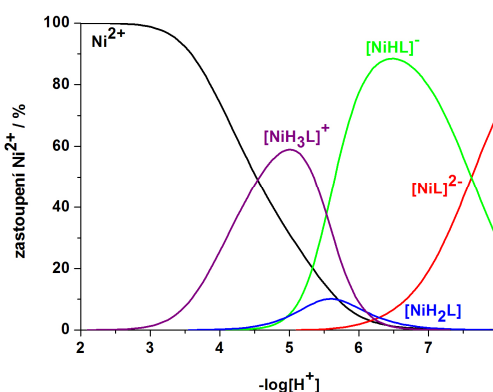
(A)



(B)



(C)



(D)

Obr. 7: Distribuční diagramy volného ligandu (10), $c_L = 4$ mM (A) a systémů M-(10) (M = Cu^{2+} (B), Zn^{2+} (C) a Ni^{2+} (D), ligand:kov v poměru 1:1, $c_L = c_M = 4$ mM, konstantní iontová síla 0,1M KNO_3 , 25 °C).

Distribuční diagram ligandu (10) je mnohem bohatší než v případě ligandu (7) (ligand (10) nese další (de)protonizované skupiny). Úbytek protonizované částice $[H_6L]^{2+}$ se děje v silně

kyselé oblasti (pH ~ 0). Při hodnotě pH ~ 1 se začíná tvořit částice $[\text{H}_5\text{L}]^+$, maximálního zastoupení nabývá v kyselé oblasti při pH ~ 2. Elektroneutrální částice $[\text{H}_4\text{L}]$ se objevuje při pH ~ 2, maximálního zastoupení (90 %) dosáhne při pH ~ 5. Částice $[\text{H}_3\text{L}]^-$ vzniká ve slabě kyselé oblasti pH ~ 4, tato částice nabývá maximálního zastoupení (70 %) při hodnotě pH ~ 7. Částice $[\text{H}_2\text{L}]^{2+}$ a $[\text{HL}]^{3-}$ vznikají při pH ~ 6 a pH ~ 9. Maximálního zastoupení nabývají při pH ~ 9 (90 %) a pH ~ 11 (40 %). Deprotonizovaný ligand $[\text{L}]^{4-}$ vzniká při pH nad ~ 10.

Tab. 8: Protonizační konstanty ligandu (10)

h	$\log \beta_h$	$\text{p}K_{\text{Ah}}$
1	$11,43 \pm 0,01$	11,43
2	$22,85 \pm 0,01$	11,42
3	$30,31 \pm 0,01$	7,45
4	$36,56 \pm 0,01$	6,25
5	$40,17 \pm 0,01$	3,61
6	$41,47 \pm 0,01$	1,31

V systému Cu^{2+} :ligand (v poměru 1:1) začíná komplexace při pH ~ 1, vzniká protonizovaný komplex $[\text{CuH}_3\text{L}]^+$ (maximálního zastoupení 90 % nabývá při pH ~ 3). Při pH ~ 2 se začíná tvořit částice $[\text{CuH}_2\text{L}]$, maximálního zastoupení nabývá při hodnotě pH ~ 4,5 (70 %). Předposlední částice $[\text{CuHL}]^-$ vzniká při pH ~ 3 a maximálního zastoupení dosahuje v hodnotě pH ~ 6. Částice $[\text{CuL}]^{2-}$ vzniká v slabě kyselém prostředí (pH ~ 5), v neutrální oblasti pH je jedinou částicí v roztoku.

Při pH ~ 3 se začíná tvořit komplex $[\text{ZnH}_3\text{L}]^+$, maximální zastoupení 20 %. Částice $[\text{ZnH}_2\text{L}]$ je v systému objevuje při pH ~ 4 (30 %). Kolem této hodnoty pH se začíná tvořit částice $[\text{ZnHL}]^-$, maximálního zastoupení nabývá v hodnotě pH ~ 6 (90 %). Poslední částice $[\text{ZnHL}]^{2-}$ vzniká ve slabě kyselém prostředí (pH ~ 5) a v bazické oblasti je jedinou částicí v roztoku.

Komplexace Ni^{2+} začíná při pH ~ 3 tvorbou komplexu $[\text{NiH}_3\text{L}]^+$, který nabývá maximálního zastoupení 60 %. Dále ve slabě kyselém prostředí pH ~ 4,5 se tvoří částice $[\text{NiHL}]^-$, maximální zastoupení 90 %. Předposlední částice se $[\text{NiH}_2\text{L}]$ také vzniká ve slabě kyselé oblasti pH ~ 4,5 (10 %). Poslední částice $[\text{ZnL}]^{2-}$ vzniká ve slabě kyselém prostředí (pH ~ 6) a v bazické oblasti je jedinou částicí v roztoku.

Tab. 9: Konstanty stability a protonizační konstanty komplexů Cu-(10), Zn-(10) a Ni-(10)

kation	<i>h</i>	<i>l</i>	<i>m</i>	$\log\beta_{hlm}$	pK_{Ah}
Cu(II)	0	1	1	$23,17 \pm 0,05$	
	1	1	1	$30,19 \pm 0,04$	6,90
	2	1	1	$35,33 \pm 0,04$	5,14
	3	1	1	$39,28 \pm 0,02$	3,95
Zn(II)	0	1	1	$16,26 \pm 0,03$	
	1	1	1	$23,64 \pm 0,02$	7,39
	2	1	1	$28,84 \pm 0,03$	5,20
	3	1	1	$33,89 \pm 0,05$	5,05
Ni(II)	0	1	1	$16,09 \pm 0,08$	
	1	1	1	$23,71 \pm 0,04$	7,62
	2	1	1	$28,67 \pm 0,18$	4,96
	3	1	1	$34,77 \pm 0,05$	6,11

3.7. Srovnání termodynamických vlastností komplexů Cu-(7) a Cu-(10)

V Tab. 10 jsou srovnány protonizační konstanty studovaných ligandů s jejich analogy. První dvě protonizační konstanty ligandu (7) (10,31 a 9,88) odpovídají protonizaci dvou makrocyclických aminoskupin v polohách *trans*. K protonizaci aminoskupiny na *p*-aminobenzylové skupině dochází v kyselé oblasti (3,44).

První dvě protonizační konstanty ligandu (10) (11,43 a 11,42) opět odpovídají protonizaci dvou aminoskupin makrocyclického v polohách *trans*. K protonizaci methylfosfonátových pendantních skupin dochází ve slabě kyselé oblasti (7,45 a 6,25). V silně kyselé oblasti pH pak dochází k protonizaci aminoskupiny na *p*-aminobenzylové skupině (3,61). K dalším protonizacím dochází při extrémně nízkých pH (poslední pozorovaná pK_A 1,31).

U dříve studovaných derivátů (viz. Tab. 10) byla pozorována anomálie, kdy docházelo k prohození pořadí protonizačních konstant ($pK_A(HL) < pK_A(H_2L)$). Tento jev lze vysvětlit přítomností vodíkových vazeb, které stabilizují dvojnásobně protonizovaný skelet. Při odštěpení jednoho protonu dojde k vytvoření méně stálé konformace a tedy k zeslabení vodíkových vazeb a poslední proton se odštěpí snadněji (nižší hodnota $pK_A^{[46]}$). Tomuto efektu lze přisoudit i netypicky malý rozdíl mezi pK_A částic HL^{3-} a H_2L^{2-} v případě ligandu (10).

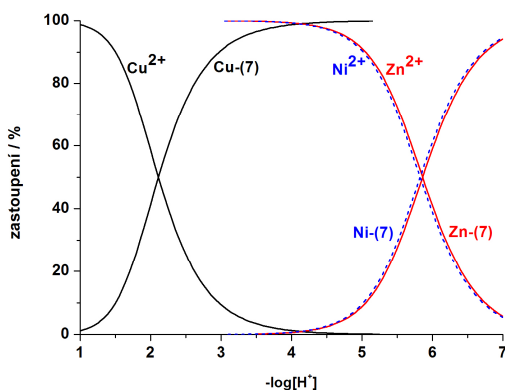
Přítomnost pendantních skupin ovlivňuje bazicitu dusíkových atomů na cyklu. Aminoskupina, která nese methylfosfonovou funkci, je velmi bazická díky delokalizaci vysokého záporného náboje na pendantu 2⁻. Přítomnost methylfosfinových funkcí naopak bazicitu aminokyselin snižuje, protože náboj fosfinátových pendantů je pouze 1⁻ a více se uplatňuje indukční efekt na atomu fosforu.

V Tab. 11 jsou srovnány konstanty stability komplexů studovaných ligandů s jejich analogy. Konstanty stability odpovídají obecnému trendu v Irwingově-Williamsově řadě.

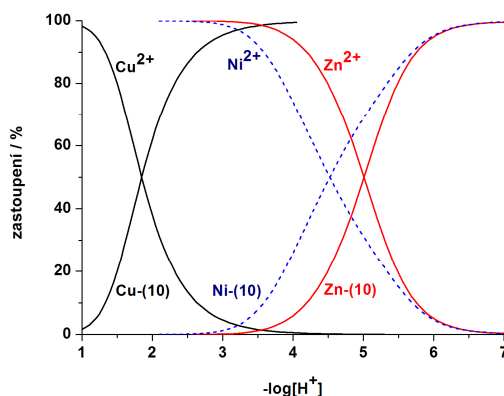
Konstanty stability studovaných ligandů **(7)** a **(10)** s měďnatými ionty byly stanoveny na hodnoty $\log b_{ML} = 18,3$ pro Cu-**(7)** a 23,2 pro Cu-**(10)**. Konstanty stability pro Zn^{2+} a Ni^{2+} komplexy byly stanoveny na hodnoty $\log b_{ML} \sim 11$ pro Zn/Ni-**(7)** a ~ 16 pro Zn/Ni-**(10)**. Z Tab. 11 je patrné, že cyklam tvoří nejstabilnější komplexy se všemi uvedenými ionty. Konstanty stability studovaného ligandu **(10)** a analogu 1,8- $H_4te^{Me_2}2p$ jsou velmi podobné.

Na Obr. 8 jsou zobrazeny součtové distribuční diagramy systému **(7)** a **(10)**. V rozmezí pH 2–4 (systém M-**(7)** **(A)**) je pouze komplexován měďnatý kation. Zinečnaté a nikelnaté ionty jsou komplexovány v rozmezí pH 4,5–6. Systém M-**(10)** **(B)** komplexuje měďnaté ionty už v rozmezí 1–3,5. Zinečnaté a nikelnaté ionty jsou komplexovány až při vyšších hodnotách pH (4,5–5). V obou případech lze na základě vhodně zvoleného pH přednostně komplexovat ionty mědi (nedochází ke konkurenčním reakcím s ionty zinku a niklu).

Z distribučních diagramů je patrná možnost ošetření selektivní komplexace měďnatých iontů volbou vhodného pH; oba studované ligandy vykazují podobnou selektivitu (jak je patrné i z zhruba sedmiřádového rozdílu hodnot konstant stability Cu^{2+} komplexů a Zn^{2+}/Ni^{2+} komplexů, pozorovaných pro oba ligandy (Tab. 11); poněkud výhodnější se jeví ligand s fosfinátovými pendantními skupinami **(7)**.



(A)



(B)

Obr. 8: Součtové distribuční diagramy systému M-**(7)** **(A)** a M-**(10)** **(B)** ($M = Cu^{2+}$, Zn^{2+} a Ni^{2+}), ligand:kov v poměru 1:1, $c_L = c_M = 4$ mM, konstantní iontová síla 0,1M KNO_3 , 25 °C.

Tab. 10: Srovnání protonizačních konstant studovaných ligandů s jejich analogy

<i>h</i>	(7)	(10)	1,8-H ₄ ^{Me₂} te2p ^{[24]i}	1,8-H ₄ te2p ^{[46]i}	cyklam ^{[47]i}
1	10,31	11,43	11,47		11,29
2	9,88	11,42	12,17	26,41	10,19
3	3,44	7,45	7,20	6,78	1,61
4		6,25	6,33	5,36	1,91
5		3,61	1,52	1,15	
6		1,31			

ⁱstrukturní vzorce látek jsou uvedeny na Obr. 2, str. 17

Tab. 11: Srovnání konstant stability studovaných ligandů s jejich analogy

kation	<i>h</i>	<i>l</i>	<i>m</i>	(7)	(10)	1,8-H ₄ ^{Me₂} te2p ^{[24]i}	1,8-H ₄ te2p ^{[48]i}	cyklam ^{[49]i}
Cu(II)	0	1	1	18,25	23,17	24,03	25,40	27,20
	1	1	1	22,12	30,19	30,92	32,45	
	2	1	1		35,33	35,97	37,55	
	3	1	1		39,28			
Zn(II)	0	1	1	11,02	16,26	17,56	20,35	15,50
	1	1	1	16,50	23,64	24,57	27,52	
	2	1	1		28,84	28,80	31,96	
	3	1	1		33,89			
Ni(II)	0	1	1	11,09	16,09	15,55	21,99	22,20
	1	1	1	16,53	23,71	22,82	29,30	
	2	1	1		28,67	27,90	34,07	
	3	1	1		34,77			

ⁱstrukturní vzorce látek jsou uvedeny na Obr. 2, str. 17

3.8. Formační a disociační kinetiky

Data byla zpracována a fitována pomocí programu Gnuplot^[50].

Závislost absorbance na čase pro formační kinetiky byla fitována podle následující rovnice (1):

$$A(t) = A_{\infty}(1 - e^{-k_{\text{obs}}t}). \quad (1)$$

Získaná konstanta pseudoprvního řádu k_{obs} byla vydělena analytickou koncentrací měďnatých iontů c_{Cu} ve vzorku, tím byla získána rychlostní konstanta druhého řádu $^f k_2$ ($v = ^f k_2 c_{\text{Cu}} c_{\text{L}}$).

Získané $^f k_2$ pro různé hodnoty pH systému Cu-(7) byly vyneseny do grafu a proloženy rovnicí (2)

$$^f k_2 = \frac{^f k_{[\text{H}_2\text{L}]} + ^f k_{[\text{H}_3\text{L}]^+} \times K_2 \times [\text{H}^+]}{1 + K_2 \times [\text{H}^+]}. \quad (2)$$

Graf pro formační kinetiku systému Cu-(10) byl fitován podle následující rovnice (3)

$$^f k_2 = \frac{^f k_{[\text{H}_2\text{L}]^{2-}} + ^f k_{[\text{H}_3\text{L}]^-} \times K_3 \times [\text{H}^+] + ^f k_{[\text{H}_4\text{L}]} \times K_3 \times K_4 \times [\text{H}^+]^2 + ^f k_{[\text{H}_5\text{L}]^+} \times K_3 \times K_4 \times K_5 \times [\text{H}^+]^3}{1 + K_3 \times [\text{H}^+] + K_3 \times K_4 \times [\text{H}^+]^2 + K_3 \times K_4 \times K_5 \times [\text{H}^+]^3}. \quad (3)$$

Závislost absorbance na čase pro disociační kinetiky byla fitována kinetikou pseudoprvního řádu podle následující rovnice (4):

$$A(t) = A_0 e^{-k_{\text{obs}}t} + A_{\infty}. \quad (4)$$

Závislost k_{obs} na koncentraci kyseliny byla fitována podle rovnice (5):

$$k_{\text{obs}}([\text{H}^+]) = \frac{k_0 + k_1 \times K \times [\text{H}^+]}{1 + K \times [\text{H}^+]}, \quad (5)$$

kde k_0 a k_1 jsou rychlostní konstanty.

Pro analýzu závislosti rychlostních konstant k_0 a k_1 na teplotě byla použita Arrheniova (6) a Eyringova rovnice (7):

$$k(T) = Q e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (6)$$

$$k(T) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}, \quad (7)$$

kde R je univerzální plynová konstanta, Q je předexponenciální faktor v Arrheniově rovnici, k_B je Boltzmanova konstanta a h je Planckova konstanta. Parametry ΔS^\ddagger a ΔH^\ddagger jsou aktivační entropie a aktivační entalpie.

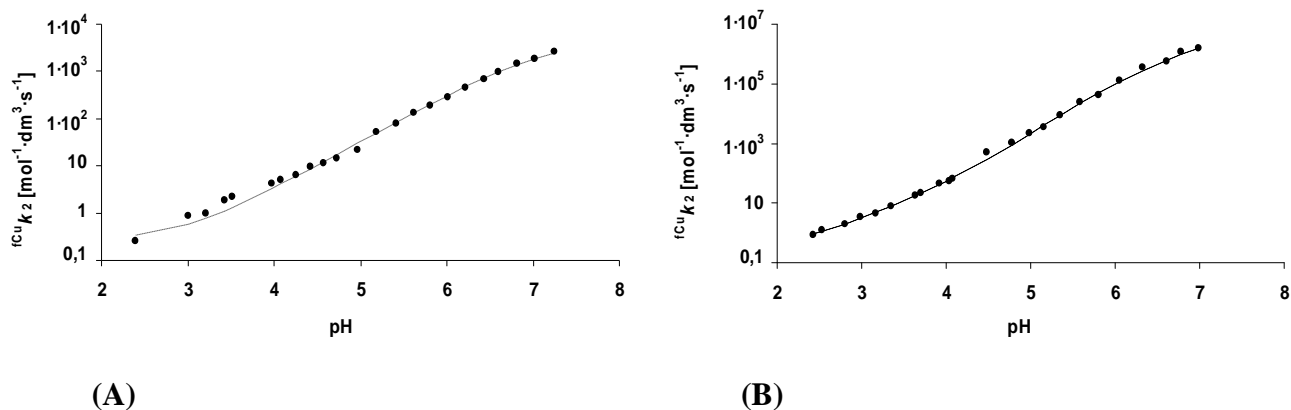
Pro popis chování rovnovážné konstanty K s teplotou byla použita rovnice (8)

$$K(T) = e^{\frac{\Delta S^0}{R}} e^{-\frac{\Delta H^0}{RT}}, \quad (8)$$

kde parametr ΔS^0 a ΔH^0 jsou změna entropie a entalpie reakce.

3.8.1. Formační kinetiky komplexu (7) a (10)

Získané ${}^{\text{fCu}}k_2$ pro různé hodnoty pH byly vyneseny do grafu na Obr. 9. Data byla proložena rovnicí (2) pro Cu-(7) odpovídající dvoučasticovému modelu a data pro Cu-(10) byla proložena rovnicí (3) odpovídající čtyřčasticovému modelu. Hodnoty získaných rychlostních konstant studovaných ligandů a jejich analogů jsou uvedeny v Tab. 12. Mechanismus vzniku komplexu Cu-(7) a Cu-(10) je uveden ve Schématu 4.



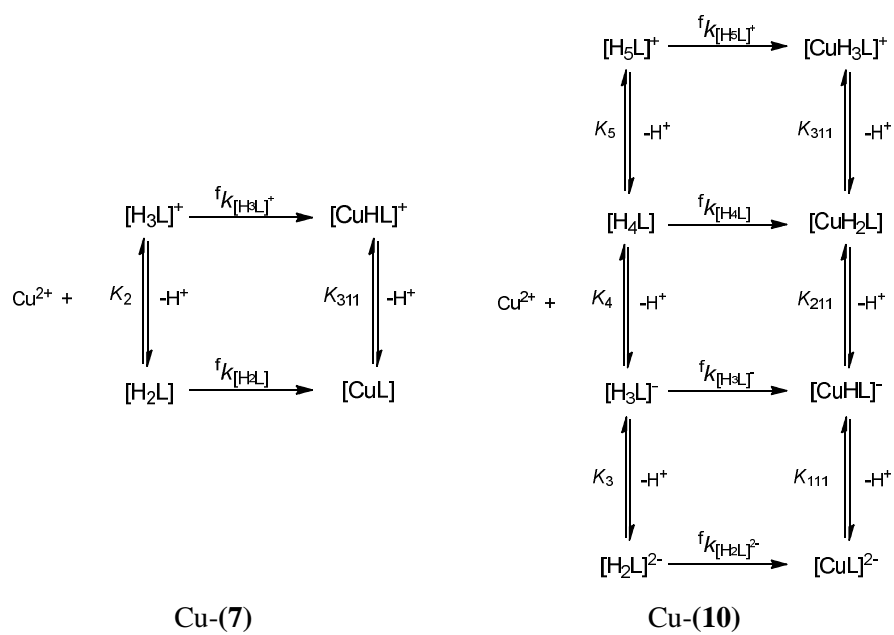
Obr. 9: Závislost ${}^{\text{fCu}}k_2$ na pH (teplota $25,0 \pm 0,1$ °C, iontová síla 0,1 M KCl), Cu-(7) (A) a Cu-(10) (B).

Tab. 12: Rychlostní konstanty ${}^{\text{fCu}}k_2$ [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$] studovaných systémů a analogů

	${}^{\text{fCu}}k_{[\text{H}_5\text{L}]}$	${}^{\text{fCu}}k_{[\text{H}_4\text{L}]}$	${}^{\text{fCu}}k_{[\text{H}_3\text{L}]}$	${}^{\text{fCu}}k_{[\text{H}_2\text{L}]}$	${}^{\text{fCu}}k_{[\text{HL}]}$
(7)			$0,26 \pm 0,1$	$4,3 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^3$	
(10)	$0,14 \pm 0,2$	$27,02 \pm 4,9$	$6,1 \cdot 10^3 \pm 1 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^6$	
1,8- $\text{H}_4^{\text{Me}_2}\text{te}2\text{p}^{[24]\text{i}}$		0,04	$2,8 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^6$	
1,8- $\text{H}_4\text{te}2\text{p}^{[54,51]\text{i}}$		0,17	$1,38 \cdot 10^3$	$1,97 \cdot 10^5$	
cyklam $^{[52]\text{i}}$				0,135	$1,05 \cdot 10^6$

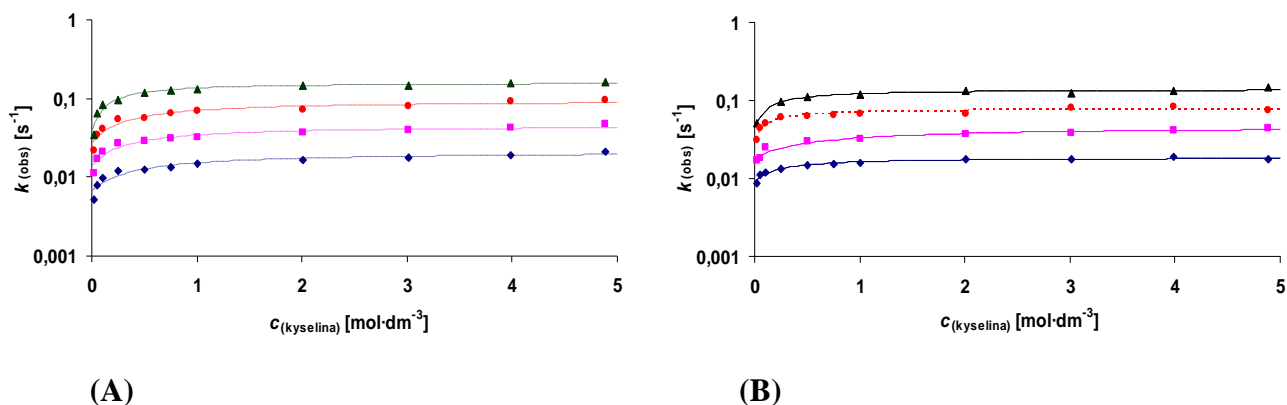
¹strukturní vzorce látek jsou uvedeny na Obr. 2, str. 17

Schéma 4: Mechanismus vzniku komplexu Cu-(7) a Cu-(10)



3.8.2. Disociační kinetiky komplexu (7) a (10)

Získané hodnoty rychlostních konstant k_{obs} byly vyneseny v závislosti na koncentraci kyseliny chloristé pro jednotlivé teploty. Tyto body byly proloženy fitováním dle rovnice (5) a grafy závislosti systému Cu-(7) a Cu-(10) jsou uvedeny na Obr. 10. V Tab. 13 jsou uvedeny konstanty k_{obs} a poločasy disociace studovaných komplexů a jejich analogů.



Obr. 10: Závislost k_{obs} na koncentraci kyseliny chloristé při různých teplotách; (A): Cu-(7), (B): Cu-(10), ♦: 298 K, ■: 308 K, ●: 318 K, ▲: 328 K.

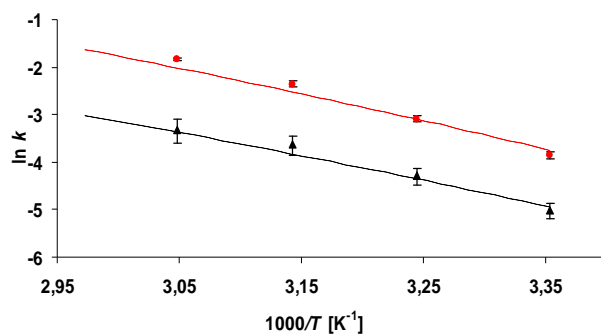
Tab. 13: Poločas disociace komplexů Cu-(7), Cu-(10) a jejich analogů

	$k_{\text{obs}} [\text{s}^{-1}]^{\text{i}}$	$t_{1/2}$
Cu-(7)	$1,47 \cdot 10^{-2}$	47,0 s
Cu-(10)	$1,59 \cdot 10^{-2}$	43,7 s
Cu-1,8-H ₄ ^{Me2} te2p ^{[24]ii}	$4,62 \cdot 10^{-3}$	2,5 min
Cu-1,8-H ₄ te2p ^{[54]ii}	$5,85 \cdot 10^{-4}$	19,7 min
Cu-cyklam ^[53]	$5,52 \cdot 10^{-4}$	20,9 min

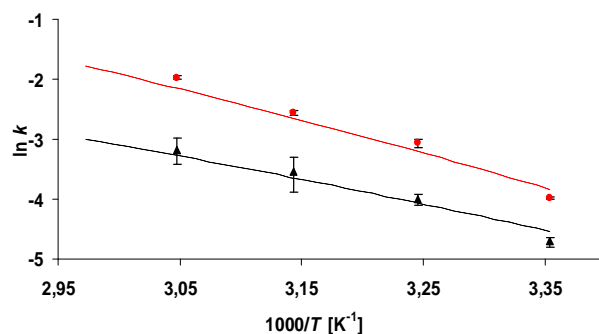
ⁱ disociace komplexů v kyselém prostředí (1,0 M HClO₄), teplotě 25 °C a iontové síle 5,0 M NaClO₄

ⁱⁱstrukturní vzorce látek jsou uvedeny na Obr. 2, str. 17

Hodnoty rychlostních konstant k_0 a k_1 , hodnoty rovnovážné konstanty K jsou vyneseny v grafech na Obr. 11, Obr. 12 a Obr. 13 v linearizovaných formách rovnic (6), (7) a (8) proti reciproké hodnotě T .

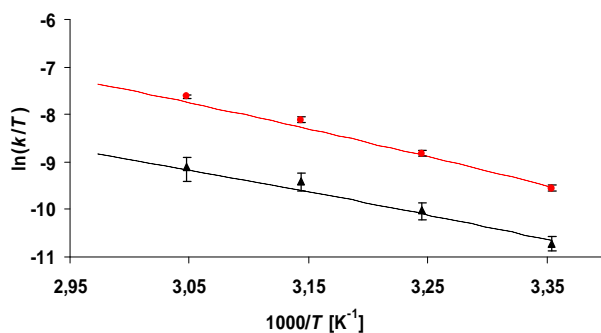


(A)

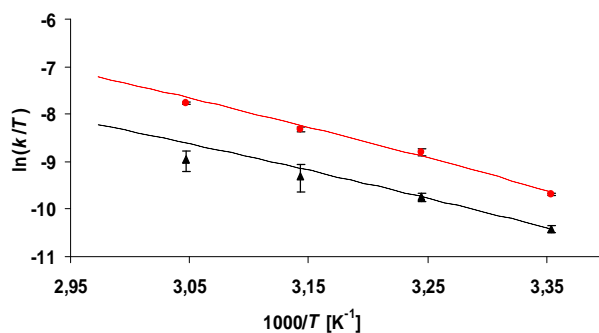


(B)

Obr. 11: Teplotní závislost rychlostních konstant k_0 a k_1 linearizovaná dle Arrheniovy rovnice; (A): Cu-(7), (B): Cu-(10), \blacktriangle : k_0 [s^{-1}] a \bullet : k_1 [$s^{-1} \cdot dm^3 \cdot mol^{-1}$].

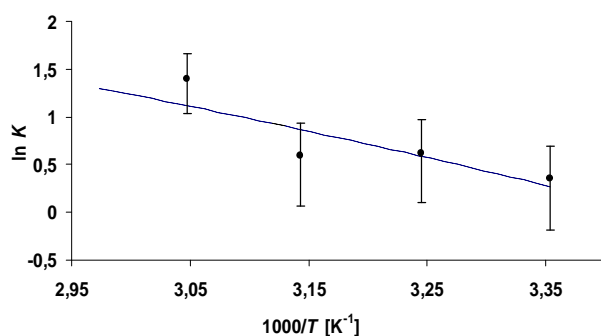


(A)

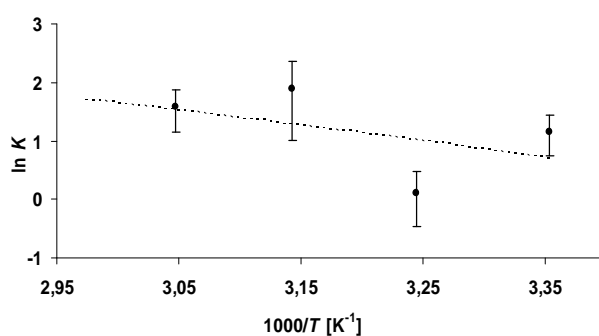


(B)

Obr. 12: Teplotní závislost rychlostních konstant k_0 a k_1 linearizovaná dle Eyringovy rovnice; (A): Cu-(7), (B): Cu-(10), \blacktriangle : k_0 [s^{-1}] a \bullet : k_1 [$s^{-1} \cdot dm^3 \cdot mol^{-1}$].



(A)



(B)

Obr. 13: Linearizovaná teplotní závislost rovnovážné konstanty; (A): Cu-(7), (B): Cu-(10).

Výsledné hodnoty disociačních kinetických parametrů jsou uvedeny v Tab. 14. Vypočtené aktivační parametry a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tab. 15 a parametry fitu K na teplotě jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 14: Vypočtené hodnoty disociačních kinetických parametrů

T [K]	Cu-(7)			Cu-(10)		
	k_0 [s ⁻¹] · 10 ³	k_1 [s ⁻¹ ·dm ³ ·mol ⁻¹] · 10 ²	K	k_0 [s ⁻¹] · 10 ³	k_1 [s ⁻¹ ·dm ³ ·mol ⁻¹] · 10 ²	K
298	6,6 ± 1,0	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,6	9,0 ± 0,7	1,9 ± 0,1	3,2 ± 1,0
308	13,6 ± 2,4	4,6 ± 0,2	1,9 ± 0,8	18,2 ± 1,6	4,7 ± 0,3	1,1 ± 0,5
318	26,3 ± 5,1	9,5 ± 0,6	1,8 ± 0,7	28,7 ± 8,1	7,7 ± 0,3	6,6 ± 3,9
328	36,1 ± 9,0	16,0 ± 0,6	4,0 ± 1,2	41,9 ± 9,1	13,9 ± 0,4	4,8 ± 1,7

Tab. 15: Aktivační parametry rychlostních konstant

		E_A [kJ·mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ·mol ⁻¹]
Cu-(7)	k_0	46,8 ± 4,6	- 137,7 ± 14,8	44,3 ± 4,6
	k_1	51,3 ± 3,6	- 100,0 ± 7,3	52,7 ± 2,3
Cu-(10)	k_0	41,3 ± 3,5	- 105,8 ± 25,2	53,2 ± 7,9
	k_1	49,7 ± 4,9	- 81,1 ± 30,9	58,6 ± 9,7
Cu-1,8-H ₄ ^{Me2} te2p ^{[24]i}	k_0	60 ± 5	- 95 ± 18	57 ± 5
Cu-1,8-H ₄ te2p ^{[54]i}	k_0	72,0 ± 0,2	- 70,7 ± 0,6	69,5 ± 0,2
	k_1	85 ± 1	- 52 ± 4	82 ± 1

ⁱstrukturní vzorce látek jsou uvedeny na Obr. 2, str. 17

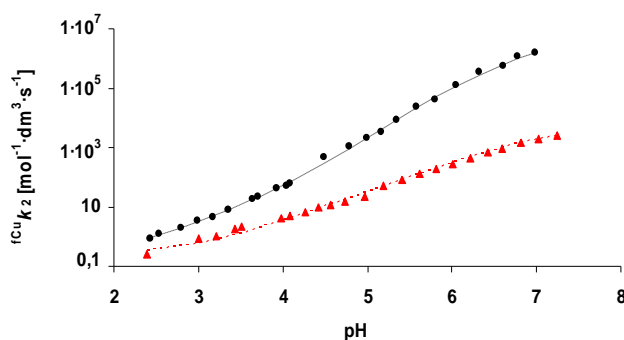
Tab. 16: Změny entropie a entalpie stanovené z protonizační konstanty

	ΔS^0 [J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]	ΔH^0 [kJ·mol ⁻¹]
Cu-(7)	86,1 ± 31,7	25,0 ± 9,9
Cu-(10)	88,2 ± 95,7	24,5 ± 30
Cu-1,8-H ₄ ^{Me2} te2p ^{[24]i}	- 30 ± 6	- 17 ± 2
Cu-1,8-H ₄ te2p ^{[54]i}	- 22,7 ± 0,9	- 8,3 ± 0,3

ⁱstrukturní vzorce látek jsou uvedeny na Obr. 2, str. 17

3.9. Srovnání formačních a disociačních kinetik komplexu (7) a (10)

Formační kinetiky byly pro oba ligandy měřeny v rozmezí pH ~ 2,5–7. Data pro ligand s methylfosfinátovými pendantními rameny (7) byla fitována rovnicí odpovídající dvoučásticovému modelu (Rovnice (2)), data ligandu s methylfosfonátovými pendantními rameny (10) byla fitována rovnicí odpovídající čtyřčásticovému modelu (Rovnice (3)). Odvozené rovnice odpovídají mechanismu uvedenému ve Schématu 4. V Tab. 12 jsou uvedeny rychlostní konstanty ${}^{\text{fCu}}k_2$ studovaných komplexů ligandů (7), (10) a jejich analogů. Grafické srovnání rychlostních konstant je znázorněno na Obr. 14. Je zjevné, že komplexace mědi ligandem (10) je cca o jeden řád (pH ~ 2–3) až tři řády (pH > 6) rychlejší než komplexace ligandem (7). To je dáno především markantním rozdílem v reaktivitě dvakrát protonizovaného ligandu – přestože je ligand (10) mnohem bazičtější než ligand (7), je odpovídající rychlostní konstanta vyšší téměř o čtyři řády (Tab. 12). To je patrně způsobeno faktem, že deprotonizovaná fosfonátová skupina (s nábojem 2–) je mnohem lepším akceptorem protonu z makrocyclického skeletu a usnadňuje tak uvolnění dutiny makrocyclu pro komplexaci měďnatého iontu. Reaktivita protonizovaných částic $[\text{H}_3\text{L}]^+$ (7) a $[\text{H}_5\text{L}]^+$ (10) je srovnatelná, neboť z nábojového hlediska jsou obě částice srovnatelné – mají dvakrát protonizovaný makrocyclický skelet, nesou protonizovanou aminobenzylovou skupinu a každá jejich pendantní skupina nese jeden záporný náboj (zcela deprotonizovaný fosfinát, jednou protonizovaný fosfonát). S deprotonizací pendantních fosfonátových skupin se reaktivita zvyšuje díky silnější elektrostatické interakci mezi iontem kovu a dvojnásobně negativně nabitou pendantní skupinou.



Obr. 14: Závislost ${}^{\text{fCu}}k_2$ na pH (teplota $25,0 \pm 0,1$ °C, iontová síla 0,1 M KCl);
▲: Cu-(7), ●: Cu-(10).

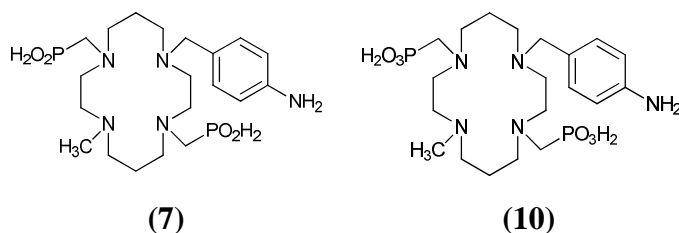
Kysele katalyzovanou dekomplexací („acid-assisted decomplexation“) byly stanoveny poločasy disociace Cu-(**7**) ~ 47 s a Cu-(**10**) ~ 44 s v prostředí 1 M HClO₄ a teplotě 25 °C. Poločasy disociace dříve studovaných derivátů jsou v porovnání s připravenými ligandy delší (1,8-H₄^{Me2}te2p ~ 2,5 min a 1,8-H₄te2p ~ 19,7 min).

Dále byly vypočteny aktivační parametry rychlostních konstant pro jednotlivé elementární kroky. Z Tab. 14 a 15 je patrné, že aktivační parametry nových derivátů a jejich dříve publikovaných analogů jsou podobné – tj. mají analogický mechanismus.

Ze studií bylo zjištěno, že nové deriváty (**7**) a (**10**) mají vhodné vlastnosti pro komplexaci mědi – velmi rychlá komplexace, vzniklé komplexy jsou kineticky labilní a vykazují vysokou selektivitu při dané hodnotě pH.

4. Závěr

V rámci této diplomové práce byly připraveny dva nové bifunkční ligandy **(7)** a **(10)** odvozené od cyklamového skeletu. Na cyklamový skelet byla navázána methylfosfinátová a methylfosfonátová pendentní ramena. Zbylé dva dusíky v poloze *trans* byly substituovány methylovou skupinou a *p*-aminobenzylovou skupinou.



Termodynamické vlastnosti byly zkoumány pomocí potenciometrických titrací. Ze získaných protonizačních konstant a konstant stabilit bylo potvrzeno, že plně substituované ligandy jsou velmi vhodnými kandidáty pro selektivní komplexaci dvojmocné mědi. Studované makrocyclické látky **(7)** a **(10)** tvoří velmi stabilní komplexy s Cu^{2+} ($\log b_{\text{ML}} = 18,3$ pro Cu-**(7)** a $23,2$ pro Cu-**(10)**). Konstanty stability pro Zn^{2+} a Ni^{2+} komplexy byly stanoveny na hodnoty $\log b_{\text{ML}} \sim 11$ pro Zn/Ni-**(7)** a ~ 16 pro Zn/Ni-**(10)**. V rozmezí pH 2–4 (systém Cu-**(7)**) a v rozmezí pH 2–3 (systém Cu-**(10)**) jsou v roztoku přítomny pouze komplexní částice s měďnatými ionty. Zinečnaté a nikelnaté komplexní částice jsou tvořeny až při vyšších hodnotách pH.

Dále byly zkoumány formační a disociační kinetiky komplexů obou ligandů.

Formační kinetiky byly pro oba ligandy měřeny v rozmezí pH $\sim 2,5$ – 7 . Data pro ligand s methylfosfinátovými pendentními rameny **(7)** byla fitována rovnicí odpovídající dvoučásticovému modelu a data ligandu s methylfosfonátovými pendentními rameny **(10)** byla fitována rovnicí odpovídající čtyřčásticovému modelu.

Kysele katalyzovanou dekomplexací („acid-assisted decomplexation“) byly stanoveny poločasy disociace (Cu-**(7)** ~ 47 s a Cu-**(10)** ~ 44 s v 1 M HClO_4 a teplotě 25°C) a byly vypočteny aktivační parametry rychlostních konstant pro jednotlivé elementární kroky. Stanovené poločasy disociace jsou v porovnání s ligandy, které byly připraveny naší pracovní skupinou dříve ($1,8\text{-H}_4^{\text{Me}_2}\text{te}2\text{p} \sim 2,5$ min a $1,8\text{-H}_4\text{te}2\text{p} \sim 19,7$ min), významně kratší.

Připravené ligandy s plně substituovaným cyklamovým skeletem vykazují termodynamicky velmi stálé a kineticky méně stálé komplexy s vysokou selektivitou

pro komplexaci Cu(II). Tyto vlastnosti nabízejí možnost využití těchto látek při separaci radioizotopů mědi (oddělení mateřských/dceřiných izotopů zinku a niklu) a následného použití radioizotopů mědi (^{64}Cu , ^{67}Cu) v nukleární medicíně, a v diagnostických i terapeutických aplikacích.

I když je ligand **(7)** selektivnější (viz. Obr. 8). je formační kinetika komplexu s ligandem **(10)** mnohem rychlejší, což z ligandu **(10)** činí velmi slibný derivát pro další studie.

V budoucnu bychom se rádi zabývali studiem formačních kinetik zinečnatých komplexů. Dále pak navázáním ligandů na vhodný makromolekulární nosič (např. pomocí sulfoamidové vazby).

5. Seznam zkratek

DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
EtOH	ethanol
EZ.....	elektronový záchyt
IPAV	isopropanol : konc. amoniak : voda
keV	kiloelektronvolt ($1 \text{ eV} = 1,602176 \cdot 10^{-19} \text{ J}$)
MeOH	methanol
MeCN.....	acetonitril
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
NBB	<i>p</i> -nitrobenzylbromid
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
PET	positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
RaNi	Raneyův nikl
R_f	retardační (retenční) faktor
RTG	rentgenové difrakční metody
RVO	rotační vakuová odparka
SPECT	single photon emission computed tomography (jednofotonová emisní počítačová tomografie)
$t_{1/2}$	poločas rozpadu
TLC	thin layer chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
TMSBr	trimethylsilylbromid

6. Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat lidem, kteří mi byli vždy oporou i v těch nejtěžších chvílích mého studia – svým rodičům. Vděčím jim za stálou podporu rodinného i finančního zázemí, díky kterému jsem mohla nerušeně studovat.

Děkuji též vedoucímu své diplomové práce Janu Kotkovi za pedagogickou i odbornou pomoc, za cenné rady, a také za jeho přátelský přístup a nekonečnou trpělivost s mou maličností. Stejně tak děkuji Petru Hermannovi za poskytnutí cenných rad převážně v oblasti syntézy.

Velký dík patří také mým kolegům a spolužákům v laboratoři, především jim děkuji za jejich přátelský přístup, příjemné pracovní prostředí a ochotu mi kdykoliv poradit a pomoci.

K této práci jmenovitě významně přispěli Ivana Císařová (stanovení krystalových struktur), Jana Havlíčková (provedení potenciometrických titrací), Tomáš David a Tereza Krchová (měření NMR spekter), Vojtěch Kubíček (měření MS spekter) a Jan Blahut (teoretické a praktické rady týkající se kinetických měření, snaha naučit mě pracovat na různých přístrojích, počítačových programech a jeho vtipných komentářů „Ach jo Mončo, ty jsi to zase rozbila“).

Speciální dík patří také mým nejbližším kolegyním a zároveň nejlepším kamarádkám Martině Benešové a Marii Martiniskové, které se především zasloužily o kulturní vyžití, a tedy i o zvolnění pracovního tempa během mého studia v Praze.

Tuto diplomovou práci věnuji in memoriam ženě, která byla mému srdci nejbližší a této chvíli se bohužel nedožila. Anežka Štětínová mi svou nekonečnou podporou a nakažlivým optimismem napomohla k dokončení této práce a také mě podpořila v uskutečnění mých profesních snů. Děkuji, babičko.

7. Použitá literatura

- [1] W. Loveland, D. J. Morrissey, G. T. Seaborg, *Modern Nuclear Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, **2006**, 113–121, 617–639.
- [2] Ed. M. J. Welch, C. S. Rendvandly, *Handbook of Radiopharmaceuticals*, John Wiley&Sons Ltd., Chichester, **2003**.
- [3] V. Ullman, AstroNuklFyzika, [online], [cit. 2012-01-05], <http://astronuklfyzika.cz/>.
- [4] Ch. J. Jones, J. R. Thornback, *Medical Applications of Coordination Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2007**, 101–102, 200–202.
- [5] S. V. Smith, *J. Inor. Bioch.*, **2004**, 98, 1874–1901.
- [6] C. J. Anderson, M. J. Welch, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2219–2234.
- [7] J. Květina a kolektiv, *Radiofarmaka*, AVICENUM, Zdravotnické nakladatelství, Praha, **1987**, 1–106.
- [8] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků*, Informatorium, Praha, **1993**, 1455–1487.
- [9] H. Remy, *Anorganická chemie II*, SNTL, Praha, **1971**, 377–402.
- [10] F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, 6. vydání, Wiley, New York, **1999**.
- [11] F. Kašpárek, R. Pastorek, Z. Šindelář, F. Březina, *Anorganická chemie*, UPOL PřF, **2001**, 363–371.
- [12] M. C. Linder, M. Hazegh-Azam, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1996**, 63, 797–811.
- [13] S. Makkonen-Craig, Pro Gradu Dissertation, *⁶⁴Cu production, ligands and biomedical applications*, Laboratory of Radiochemistry, University of Helsinki, **2006**.
- [14] P. J. Blower, J. S. Lewis, J. Zweit, *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, 23, 957–980.
- [15] J. Kozempel, Dizertační práce, *Příprava ⁶⁴Cu a jejich perspektivních nosičů pro nukleární medicínu*, PřF UK, Praha, **2010**, 6–12.
- [16] Lawrence Berkeley National Laboratory, cit. únor 2012, [online], [cit. 2012-01-10], http://ie.lbl.gov/education/parent/Cu_iso.htm.
- [17] F. F. Dyer, G. H. Leddicotte, *The radiochemistry of copper*, National Academy of Science, National Research Council, Washington (DC) USA, **1961**, [online], [cit. 2012-02-10], <http://www.lanl.gov/cgi-bin/getfile?rc000048.pdf>.
- [18] S. S. Watanabe, J. Liang, H. Hanaoka, K. Endo, N. S. Ishioka, *Nucl. Med. Biol.*, **2009**, 36, 578–590.
- [19] X. Fan, D. J. Parker, M. D. Smith, A. Ingram, Z. Yang, J. P. K. Seville, *Nucl. Med. Biol.*, **2006**, 33, 939–944.

-
- [20] V. Majer, *Základy jaderné chemie*, SNTL druhé přepracované vydání, Praha, **1981**, 419–432.
- [21] J. Kotek, Habilitační práce, *Komplexy dvojmocné mědi s makrocyclickými ligandy*, PřF UK, Praha, **2009**, 9–11, 14–17.
- [22] S. J. Lincoln, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 255–289.
- [23] S. Füzerová, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, K. Binnemans, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2005**, 2908–2915.
- [24] I. Svobodová, J. Havlíčková, J. Plutnar, P. Lubal, J. Kotek, P. Hermann, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 3577–3592.
- [25] C. J. Mathias, S. R. Bergmann, M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.*, **1994**, 36, 1451–1455.
- [26] D. Sofrová a kolektiv, *Biochemie základní kurz*, nakladatelství Karolinum, Praha, **2009**, 46.
- [27] T. Vitha, Diplomová práce, *Syntéza 1,4-disubstituovaných derivátů cyklamu*, PřF UK, **2004**, 15–17.
- [28] G. Royal, V. Dahaoui-Gindrey, S. Dahaoui, A. Tabard, R. Guillard, P. Pullumbi, C. Lecomte, *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1971–1975.
- [29] C. Bucher, G. Royal, J. M. Barbe, R. Guillard, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 2315–2318.
- [30] E. J. Gabe, Y. Le Page, L. Prasad, G. R. Weisman, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **1982**, B38, 2752–2754.
- [31] R. W. Alder, E. Heilbronner, E. Honegger, A. B. McEwen, R. E. Moss, E. Olefirowicz, P. A. Petillo, R. B. Sessions, G. R. Weisman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 6580–6591.
- [32] J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, J. Rohovec, I. Lukeš, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, 65, 243–266.
- [33] J. Rohovec, R. Gyepes, I. Císařová, J. Rudovský, I. Lukeš, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 1249.
- [34] W. L. F. Armerego, Ch. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed. Burlington, **2003**.
- [35] E. Hugo, H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512–7515.
- [36] E. K. Barefield, F. Wagner, A. W. Herbinger, A. R. Dahl, *Inorg. Synth.*, **1976**, 16, 220–225.
- [37] I. Meunier, A. K. Mishra, B. Hanquet, P. Cocolis, R. Guillard, *Can. J. Chem.*, **1995**, 73, 685–695.
- [38] M. Paúrová, Bakalářská práce, *Bifunkční chelatanty dvojmocné mědi*, PřF UK, Praha, **2010**, 19.
- [39] G. R. Weisman, S. C. H. Ho, V. Johnson, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 335–338.
- [40] J. Plutnar, Dizertační práce, *Polycyclické tetraazamakrocycly*, PřF UK, Praha, **2007**, 35–36.

-
- [41] J. Rudovský, Diplomová práce, *Příprava NMR studium bifunkčních chelátů odvozených od DO3A*, PřF UK, Praha, **2002**, 43–44.
- [42] J. Blahut, Bakalářská práce, *Bifunkční chelatanty dvojmocné mědi*, PřF UK, Praha, **2011**.
- [43] J. McMurry, *Organická chemie*, VUTIUM, Praha, **2007**, 903.
- [44] A. Okáč, *Analytické reakce*, Československá akademie věd, Praha, **1965**, 207, 223–227.
- [45] M. Kývala, *Program Opium*, [online], [cit. 2012-03-10],
<http://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>.
- [46] J. Kotek, P. Vojtíšek, I. Císařová, P. Hermann, P. Juřečka, J. Rohovec, I. Lukeš, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, 65, 1289–1316.
- [47] R. D. Hancock, R. J. Motekaitis, J. Mashishi, I. Cukrowski, J. H. Reibenspies, A. E. Martell,
J. Chem. Soc. Perkin Trans., **1996**, 2, 1225–1929.
- [48] I. Svobodová, P. Lubal, J. Plutnar, J. Havlíčková, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2006**, 5184–5197.
- [49] R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York and London, **1989**, 6, 214.
- [50] T. Williams, C. Kelley, *Gnuplot* version 4.4.2, [online], [cit. 2012-03-25],
<http://www.gnuplot.info/>.
- [51] P. Lubal, J. Maleček, P. Hermann, J. Kotek, J. Havel, *Polyhedron*, **2006**, 25, 1884–1892
- [52] M. Maader, Y. -M. Neuhold, G. Puxty, P. King, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, 5, 2836–2841.
- [53] L. H. Chen, C. S. Chung, *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 1880–1883.
- [54] J. Kotek, P. Lubal, P. Hermann, I. Císařová, I. Lukeš, T. Godula, I. Svobodová, P. Táborský, J. Havel, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 233–248.